

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

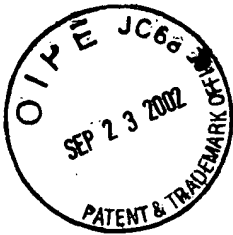
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



RECEIVED  
SEP 26 2002  
TECH CENTER 1600/2900

#21

# CERTIFICATION OF TRANSLATION

The undersigned, Jessica T. Abreu, whose address is 2334 N. Van Buren Court, Arlington, VA 22205-1939, USA, declares and states as follows:

I am well acquainted with the English and French languages; I have in the past translated numerous French documents of legal and/or technical content into English; and I am certified by Georgetown University and accredited by the American Translators Association in French into English translation.

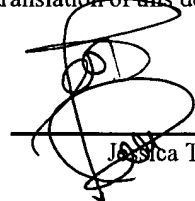
I have been asked to translate and/or review a 35-page French patent application, containing 9 additional pages of figures, with a national registration number of **96 13176**, filed on **October 29, 1996**, and entitled: **"FRAGMENTS D'ANTICORPS À CHAÎNE UNIQUE ANTI-P53 ET UTILISATION"** Inventors: **Bracco, Laurent; and Debussche, Laurent**. Applicant: **Rhone-Poulenc Rorer SA**.

I hereby declare that the attached translation of the document referenced above is, to the best of my knowledge and ability, a true and accurate translation of the original French document.

And I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true, that all statements made on information and belief are believed to be true, and that falsification of these statements and the like is punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code.

I therefore attach my Certification of Translation to the English translation of this document.

July 11, 2002  
Date

  
\_\_\_\_\_  
Jessica T. Abreu

City/County of  
Commonwealth of Virginia

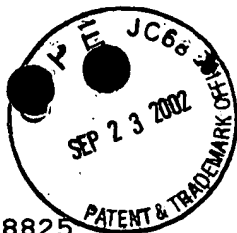
The foregoing instrument was subscribed and sworn to before me on this  
11<sup>th</sup> day of July 2002 by

  
\_\_\_\_\_  
Notary Public

Divina A. Rutherford  
Notary Public  
Commonwealth of Virginia  
My Commission Expires Sept. 30, 2004

My commission expires on: \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



WO 98/18825

1

PCT/FR97/01921

SINGLE-CHAIN ANTI-P53 ANTIBODY FRAGMENTS AND USES

The present invention relates to a process for restoring a p53-dependent transactivation activity in cells exhibiting a mutated p53 protein devoid  
5 of its transcriptional factor function or whose transcriptional factor function is diminished. More particularly, the process of the invention is based on using single-chain antibodies that are able to bind the mutated p53 protein specifically. It also relates to novel molecules that are able to bind p53 proteins specifically and efficiently and that additionally make it possible to restore a p53 activity in  
10 tumor cells, as well as to the nucleic acids encoding these molecules and to the vectors containing them. This process, and the molecules of the invention, can be used in vitro or ex vivo to study the mechanism of action of p53 and its mutated forms or to purify the p53 proteins. They also offer in-vivo uses, in particular in therapeutic approaches for restoring p53 activity in pathological  
15 contexts such as, in particular, cancers.

The wild-type p53 protein is involved in regulating the cell cycle and in maintaining the integrity of the cell's genome. This protein, whose principal function is that of being an activator of the transcription of certain genes, is able, by means of a process that is not yet well defined, to block the cell in the G1  
20 phase of the cell cycle when mutations appear during replication of the genome and to set in motion a certain number of processes for repairing the DNA. Furthermore, if there is a fault in these repair processes or if mutational events appear that are too numerous to be corrected, this protein is able to induce the phenomenon of programmed cell death termed apoptosis. In this way, the p53  
25 protein acts as a tumor

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

suppressor by eliminating cells that have differentiated in an abnormal manner or whose genome has been damaged.

This main function of p53 depends on its transcription factor function, in other words on its double ability to recognize specific sequences in  
5 the genomic DNA and to recruit the general machinery of transcription.

The p53 protein comprises 393 amino acids that define 5 functional domains:

- the transcription activator domain, which consists of amino acids 1 to 73 and is able to bind certain factors of the general transcription machinery  
10 such as the protein TBP. This domain is also the site of a certain number of post-translational modifications. It is also the site for a large number of interactions between the p53 protein and a large number of other proteins, in particular the cell protein mdm2 or the Epstein-Barr virus (EBV) protein EBNA5, which proteins are able to block the function of the wild-type protein. Furthermore, this domain  
15 possesses amino acid sequences that are termed PEST and are susceptible to proteolytic degradation.

- the DNA-binding domain, which is located between amino acids 73 and 315. The conformation of this central domain of p53 regulates the recognition of DNA sequences that are specific for the p53 protein. This domain  
20 is the site of two types of alterations that affect the function of the wild-type protein:

- (i) interaction with proteins, such as the "large T" antigen of the SV40 virus or the E6 viral proteins of the HPV16 and HPV18 viruses, that block the function of p53 and are able to bring about its degradation by the ubiquitin  
25 system. This latter interaction can only be effected in the presence of the cell protein E6ap (enzyme E3 of the ubiquitination cascade).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**  
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(ii) point mutations that affect the function of p53 and almost all of which are located in this region.

- the nuclear localization signal, which consists of amino acids 315 to 325 and is essential for correctly directing the protein to the compartment  
5 where it will exert its main function.

- the oligomerization domain, which consists of amino acids 325 to 355. This 325 to 355 region forms a structure of the type:  $\beta$  pleated sheet (326-334)-bend (335-336)- $\alpha$ -helix (337-355). The functional alterations that are  
10 located in this region are essentially due to interaction of the wild-type protein with the different mutant forms, which forms can produce variable effects on the function of the wild-type protein.

- the regulatory domain, which consists of amino acids 365 to 393 and is a site of various post-translational modifications (glycosylations, phosphorylations, RNA binding, etc.) that modulate the function of the p53  
15 protein in a positive or negative manner. This domain plays an extremely important role in modulating the activity of the wild-type protein.

Operation of the p53 protein can be disrupted in a variety of ways.

- its function can be blocked by various factors such as, for example, the SV40 virus "large T" antigen, the Epstein-Barr virus EBNA5 protein  
20 or the mdm2 cell protein.

- the protein can be destabilized by increasing its susceptibility to proteolysis, in particular by means of interaction with the E6 protein of the human papilloma viruses HPV16 and HPV18, which protein promotes entry of p53 into the ubiquitination cycle. In this case, interaction between these two  
25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

proteins can only be effected by means of the prior binding of a cell protein, the E6ap protein, about whose binding site little is known.

- point mutations can arise within the p53 gene.
- one or both of the p53 alleles can be deleted.

5           The last two types of modifications are found in about 50% of the different types of cancer. In this regard, the mutations of the gene for p53 that have been listed in cancerous cells affect a very large part of the gene encoding this protein and result in a variety of changes to the operation of this protein. However, it can be noted that the great majority of these mutations are located in  
10 the central part of the p53 protein, which part is known to be the region of contact with the genomic sequences that are specific for the p53 protein. This explains why the principal characteristic of most of the mutants of the p53 protein is that of no longer being able to bind to the DNA sequences that are recognized by the wild-type protein and consequently no longer being able to carry out their role of  
15 transcription factor. Moreover, some mutants appear to have acquired novel functions such as the activation of certain genes at the transcriptional level.

At present, all of these modifications are grouped into three categories:

- so-called weak mutants, the product of which is a nonfunctional  
20 protein that has no effect on the operation of the wild-type protein encoded by the other allele when only one of the two alleles is mutated. The main representatives of this category are the mutants H273 and W248, with the latter being specific for the Li-Fraumeni familial syndrome of hypersusceptibility to cancerous ailments.

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- the dominant-negative mutants, the product of which is a nonfunctional protein which, when only one of the two alleles is mutated, and by interacting with the wild-type protein, is able to block operation of this protein by forming inactive mixed oligomers that are no longer able to bind to the DNA sequences that are specific for the wild-type protein. The principal representative of this category is the mutant G281.

- the dominant-oncogenic mutants, the product of which is a protein that is able, on the one hand, to block the function of the wild-type protein, like the mutants of the previous category, and, on the other hand, to promote, by means of mechanisms that are not well understood, tumor development, thereby exhibiting a gain in function. The main representative of this category is the mutant H175.

In view of its anti-tumor and apoptotic properties, and its involvement in many pathologies of the hyperproliferative type, the wild-type p53 gene has been used in gene therapy and cell therapy approaches. It has, in particular, been proposed that certain hyperproliferative pathologies, in particular cancers, be treated by administering the wild-type p53 gene in vivo, thereby restoring p53 functions. Administration may preferentially be effected by means of viral vectors, in particular adenoviral (WO94/24297) or retroviral (WO94/06910) vectors. Thus, it was demonstrated that introduction of a nucleic acid encoding the wild-type p53 protein enabled normal regulation of cell growth to be partially restored (Roth et al., Nature Medicine 2 (1996) 985). Alternative strategies based on using chimeric molecules that possess properties of the p53 type have also been developed (PCT/FR96/01111).

Another approach aimed at restoring the functions of the wild-type p53 protein is based on reversion of the endogenous mutated proteins towards a wild-type phenotype, that is to say exhibiting the tumor-suppressing and apoptotic properties of the wild-type p53. This approach ensues from the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

demonstration that the losses in function of the p53 mutants are due to a conformational change of the protein, which change is induced by the mutation(s). In this regard, application WO94/12202 demonstrates that a specific monoclonal antibody, designated pAb421 and directed against the p53 protein, is  
5 able to restore the function of binding to DNA in vitro to a certain class of mutants that are frequently represented in human cancers. However, the use of this type of compound presents significant drawbacks linked, in particular, to the large quantity of antibody required (and therefore to the associated problems of production/purification) and to their poor intracellular penetration.

10 The present application describes a more effective approach for restoring the wild-type properties of a mutant of the p53 protein. The present application describes, in particular, the construction of ligands that are especially specific for the p53 protein and that have properties that are advantageous for restoring the wild-type p53 functions. More particularly, the present application  
15 describes the construction of single-chain antibodies (ScFvs) that are specific for the p53 protein, in particular the molecule 11D3. Moreover, the present application demonstrates that the ScFvs are able to recognize p53, be expressed efficiently within a tumor cell and reactivate a part of the transactivating function of a certain class of p53 mutants.

20 As compared with the methods of the prior art, this molecule exhibits significant advantages, in particular the possibility of being expressed in situ, in substantial quantities, in a tumor cell. The results presented below are all the more unexpected because losses of affinity had often been observed when passing from a conventional antibody to an ScFv. Furthermore, the applicant has  
25 demonstrated that it is possible to express the ScFvs in the appropriate intracellular compartments, thereby enabling optimum biological activity to be obtained.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



The invention initially relates, therefore, to a process for restoring a p53-dependent transactivation activity in cells possessing a mutated p53 protein, which process comprises introducing into the said cell a single-chain antibody which is able to bind the mutated p53 protein specifically.

- 5 Advantageously, the process of the invention comprises introducing into the cell a nucleic acid containing a sequence that encodes the said single-chain antibody under the control of a promoter that is able to function in the cell. Another aspect of the invention relates to the use of a single-chain antibody that is able to specifically bind a mutated p53 protein for modifying the conformation of the said
- 10 protein. The invention also relates to the use of a single-chain antibody that is able to specifically bind a mutated p53 protein for preparing a pharmaceutical composition intended for treating hyperproliferative disorders in which a mutated p53 protein is involved. In addition, the invention concerns the use of a nucleic acid encoding a single-chain antibody that is able to bind a mutated p53 protein
- 15 specifically for preparing a pharmaceutical composition intended for treating the hyperproliferative disorders in which a mutated p53 protein is involved.

The process of the invention is therefore based in part on constructing and vectorizing single-chain antibodies that are able to bind a mutated p53 protein specifically and introducing these antibodies into cells. The

20 single-chain antibodies (ScFvs) essentially consist of a VH region linked to a VL region by an arm. The construction of ScFvs and of nucleic acid sequences that encode such modified antibodies has been described, for example, in patent US 4,946,778 or in applications WO 94/02610 and WO 94/29446, that are hereby incorporated into the present application by reference.

- 25 The present application more specifically describes the creation of a hybridoma library that produces antibodies directed against p53 and the construction, from this library, of corresponding ScFvs. It also describes

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

the cloning of the corresponding nucleic acids into expression vectors and their transfer into cells. It also demonstrates that this transfer enables the DNA-binding activity of p53 mutants, and their transactivating activity, to be efficiently restored in vivo.

5                   More particularly, the process of the invention employs ScFvs that are able to specifically bind an epitope that is present in the C-terminal region of p53, which carries the oligomerization domain and the regulatory domain. In this regard, the present application also describes a test that enables the ScFvs possessing this property to be selected by means of the ELISA technique.

10                   Even more preferably, the ScFvs employed in the process of the invention are able specifically to bind an epitope that is present in the C-terminal region of p53 between residues 320-393. In this regard, the application describes, as a specific example, the construction and expression of the ScFv ScFv 421, having the sequence SEQ ID No. 1, and of 11D3, having the  
15                   sequence SEQ ID No. 2.

                  The process of the invention can be applied generally to mutated p53 proteins that have lost, totally or partially, the ability to bind DNA, and the process of the invention enables this ability to be restored. More particularly, the process of the invention can be applied to mutated p53 proteins that have lost,  
20                   totally or partially, the transcriptional factor function of p53, and it enables this function to be restored. The degree of restoration can be total or partial. Advantageously, it is sufficient to enable the mutant to exert a tumor-suppressing function by blocking the cell cycle and/or by inducing apoptosis. The process of the invention therefore makes it possible to restore, at least partially, a tumor-  
25                   suppressing activity in cells that possess endogenous mutated p53 proteins that are devoid of this activity. Advantageously, the proteins in question are mutated

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

proteins that are present in tumor cells. As indicated above, different mutated forms of the p53 protein have been demonstrated in tumor cells. The proteins p53H273, p53W248 and p53G281 may be mentioned by way of example. The examples presented below demonstrate, in particular, that the process of the invention makes it possible to modify the conformation and the biological properties of these mutants, both in vitro and in vivo. In particular, these examples demonstrate that the ScFvs 421 and 11D3 are able to restore the ability of mutants 273 and 248 to bind DNA specifically and to induce p53-dependent transactivation.

10               The process of the invention can be implemented in vitro, ex vivo or in vivo. In vitro or ex vivo, the process and the molecules of the invention can make it possible, for example, to study the mechanism of action of p53 and its mutated forms. Furthermore, the molecules of the invention can be used to detect or purify p53 proteins, for example by coupling the molecules to a support, 15 and bringing them into contact with a solution containing p53 proteins, with this then being followed, if necessary, by visualization of the complexes that have been formed, or by an elution. In vivo, in particular in humans, they can make it possible, in pathological contexts such as hyperproliferative disorders in which a deficiency in p53 activity is observed, for this function to be restored. In this 20 regard, the process can be employed in association with other above-mentioned approaches (introduction of a wild-type p53 gene) or else in association with chemotherapy (WO96/22101). Also in vivo, the process and the molecules of the invention can be used in animals, for example, in order to determine the levels at which the ScFvs are expressed and evaluate the possibility of a therapeutic 25 approach for use in humans.

Advantageously, the cell possessing a mutated p53 protein is a mammalian tumor cell. In this regard, those cells that may more particularly be mentioned are the cells of lung (in particular not small-cell), colon, liver, brain, head and neck cancers and, more generally, any cancer in which a mutated form 30 of the p53 protein

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

is observed. Advantageously, the cell is a human tumor cell in which a p53H273, p53W248 and/or p53G281 mutant is observed (lung, colon, brain, head and neck, liver). The applicability of the process of the invention to a particular cell can easily be determined using the following methodology: the cell is first of all  
5 characterized for the presence of a mutated p53 protein. This protein is then characterized so as to determine the nature of the mutation. If this mutation is known, and in particular if it is one of the mutations listed above, the cell can be regarded as being susceptible to treatment by the process of the invention. If the mutation is an unlisted mutation, various approaches are possible. The mutated  
10 protein can first of all be isolated (or synthesized artificially) and tested, as described in the examples, for its behavior in vitro and in vivo in the presence of ScFv. This makes it possible to identify the ScFv that is appropriate for restoring the deficient functions of this protein. Another approach consists in directly testing the ScFvs on a cell culture in order to determine the biological efficacy of  
15 the ScFvs.

In order to implement the process of the invention, the ScFv is advantageously introduced into the cell, in vitro, ex vivo or in vivo, in the form of a vector carrying a nucleic acid encoding the said ScFv and under the control of a promoter that is able to function in the said cell.

20 The promoter is advantageously chosen from among the promoters that are able to function in mammalian cells, preferably human cells. More preferably, the promoter is of a type that enables a nucleic acid to be expressed in a hyperproliferative (cancerous, restenosis, etc.) cell. Various promoters may be employed in this regard. The promoter can, for example, be  
25 the native promoter of the p53 gene. The promoters can also be regions of a different origin (which are responsible for expressing other proteins or even synthetic proteins). The promoter can thus be any promoter or derived sequence that stimulates or represses the transcription of a gene specifically or non-specifically, inducibly or non-inducibly and strongly or weakly. Particular mention  
30 may be made of

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



the promoter sequences of eukaryotic or viral genes. For example, the promoter sequences can be promoter sequences that are derived from the genome of the target cell. Eukaryotic promoters that may in particular be used are ubiquitous promoters (promoter of the HPRT, PGK,  $\alpha$ -actin, tubulin, etc. genes), promoters  
5 of the intermediate filaments (promoter of the GFAP, desmin, vimentin, neurofilament, keratin, etc. genes), promoters of therapeutic genes (for example the promoter of the MDR, CFTR, factor VIII, ApoA1, etc. genes), tissue-specific promoters (promoter of the pyruvate kinase, villin, intestinal fatty acid-binding protein, smooth muscle  $\alpha$ -actin, etc. gene) or else promoters that respond to a  
10 stimulus (steroid hormone receptor, retinoic acid receptor, etc.). Similarly, the promoter sequences can be promoter sequences that are derived from the genome of a virus, such as, for example, the promoters of the adenovirus E1A and MLP genes, the CMV early promoter, or else the RSV LTR promoter, etc. Furthermore, these promoter regions can be modified by the addition of  
15 activating sequences, regulatory sequences or sequences that permit tissue-specific or high-level expression.

As indicated above, the present application also describes novel molecules that have the particularly advantageous properties of binding and reverting mutated p53 proteins. More precisely, the invention describes the  
20 construction, the vectorization and the transfer into cells of specific ScFvs (11D3, 421). The nucleic acid sequence and peptide sequence of these ScFvs are given in SEQ ID No. 1 and SEQ ID No. 2. The examples that follow demonstrate the particularly advantageous ability of these molecules (i) to specifically bind  
mutated p53 proteins in the C-terminal region, (ii) to restore the ability of these  
25 mutated proteins to bind DNA, and (iii) to restore the ability of these proteins to activate transcription. The examples furthermore demonstrate that these molecules are correctly expressed in tumor cells, thereby enabling the molecules to be used advantageously in the context of hyperproliferative disorders. Moreover, the properties of the ScFvs

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

of the invention can also be improved. In particular, it is known that the affinity of the ScFvs is influenced by the CDR regions (underlined in the sequence) and can be improved by means of routine mutagenesis/selection experiments. Thus, mutagenesis carried out on antibodies has been described, for example, by

5 Marks et al. (Bio/Technology, 10, 779-783, 1992) and by Winter G. and Milstein C. (Nature, 349, 293-299, 1991). The technologies described in these references can be applied to preparing variants of the ScFvs that have an affinity that is modified in accordance with the invention. Selection can then be carried out under the conditions described in the examples.

10 The invention therefore also relates to the 11D3 molecule, whose peptide sequence is depicted in SEQ ID No. 2, and to any variant that exhibits a modification in the CDR regions that retains the ability to bind p53 proteins. The modification can consist of a deletion, a substitution or an insertion of one or more residues in the CDR regions. Advantageously, the modification affects less

15 than 10 residues.

The present invention also relates to any nucleic acid that encodes ScFv 11D3 or any variant as defined above.

The nucleic acid according to the invention can be a ribonucleic acid (RNA) or a deoxyribonucleic acid (DNA). Advantageously, it is a

20 complementary DNA (cDNA). It can be of human, animal, viral, synthetic or semi-synthetic origin. It can be obtained in different ways, in particular by means of chemical synthesis using the sequences presented in the application and, for example, a nucleic acid synthesizer. It can also be obtained by screening libraries with specific probes, in particular those described in the application. It

25 can further be obtained by means of mixed techniques including chemical modification (elongation, deletion, substitution, etc.) of sequences that have been obtained from screening libraries. Generally, the nucleic acids of the invention can be prepared by

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

any technique known to the skilled person (see, in particular, the techniques described in patents US4,946,778 and WO94/02610, which patents are incorporated into the present application by reference). A conventional strategy for constructing nucleic acids encoding an ScFv is the following: the cDNAs

5 encoding the VH and VL regions are obtained from the hybridoma, which is producing the chosen anti-p53 antibody. For this purpose, the total RNA of the hybridoma is extracted and subjected to a reverse transcription reaction using random hexamers as primers. The use of this type of primer makes it possible to avoid using primers that are specific for immunoglobulins. The resulting cDNA

10 clones are of a length that is sufficient for cloning the V regions. When they represent an insufficient fraction of the total cDNA present, a preliminary amplification reaction can be carried out in order to produce sufficient DNA for the cloning. For this purpose, the cDNAs encoding the VH and VL regions are amplified separately. The primers employed are oligonucleotides that hybridize to

15 the opposite ends of the variable regions of each chain (H and L). The amplification product obtained using the primers that are specific for the heavy chains and the amplification product obtained using the primers that are specific for the light chains are then purified. After purification, the cDNA molecules encoding the VH and VL regions of the antibody are joined together into a single

20 chain using a nucleotide arm (L). The nucleotide arm was constructed such that one of the ends binds to the 3' end of the cDNA encoding the VH region and the other binds to the 5' end of the cDNA encoding the VL region. The sequence of the arm encodes the peptide (G4S)<sub>3</sub>. The assembled sequence, of approximately 700 bp, contains the VH-L-VL assembly, whose sequences are

25 depicted in SEQ ID No. 1 and SEQ ID No. 2, for example, in the form of an NcoI/NotI fragment.

Preferably, the nucleic acid according to the invention is a cDNA or an RNA.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

The nucleic acid according to the invention is advantageously chosen from among:

(a) all or part of the sequence SEQ ID No. 2 or of its complementary strand,

5 (b) any sequence that hybridizes with the (a) sequences and encodes an ScFv that is able to specifically bind the p53 protein, preferably within the C-terminal region,

(c) the variants of (a) and (b) resulting from the degeneracy of the genetic code.

10 The present invention also relates to any expression cassette comprising a nucleic acid as defined above, a promoter that enables it to be expressed and a transcription termination signal.

In the process of the invention, the acid is advantageously introduced into the cells by means of an administration vector that makes it  
15 possible to improve (i) the efficiency of cell penetration, (ii) targeting and/or (iii) extracellular and intracellular stability.

In one particularly preferred embodiment of the present invention, the nucleic acid is incorporated into a vector that can be of chemical (liposome, nanoparticle, peptide complex, cationic lipid or polymer, etc.), viral (retrovirus,  
20 adenovirus, herpes-virus, AAV, vaccinia virus, etc.) or plasmid origin.

The use of viral vectors is based on the natural transfection properties of viruses. Thus, it is possible to use, for example, adenoviruses, herpes viruses, retroviruses and adenoassociated viruses. These vectors are found to be particularly efficient with regard to transfection.

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



In particular, the ability of adenoviruses and retroviruses to infect tumor cells makes these viruses the vectors of choice in the context of the invention. In this regard, in a preferred embodiment of the invention, the nucleic acid is introduced in the form of a retroviral vector, that is to say in the form of a defective  
5 recombinant retrovirus whose genome comprises a nucleic acid encoding an ScFv as defined above. In another preferred embodiment of the invention, the nucleic acid is introduced in the form of an adenoviral vector, that is to say in the form of a defective recombinant adenovirus whose genome comprises a nucleic acid encoding an ScFv as defined above.

10               The vector according to the invention can also be a non-viral agent that is able to promote the transfer and expression of nucleic acids in eukaryotic cells. Synthetic or natural chemical or biochemical vectors represent an attractive alternative to natural viruses, in particular for reasons of convenience, of safety and also because of the absence of any theoretical limit  
15 with regard to the size of the DNA to be transfected. These synthetic vectors have two main functions, i.e., to compact the nucleic acid to be transfected and to promote its binding to the cell and its passage through the plasma membrane and, if the need arises, the two nuclear membranes. In order to compensate for the polyanionic nature of the nucleic acids, the non-viral vectors all possess  
20 polycationic charges. In a particular process according to the invention, the vector is a chemical or biochemical vector.

              The invention also relates to any composition that comprises at least one nucleic acid as defined above.

              It also relates to any composition that comprises at least one  
25 vector as defined above.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

It also relates to any composition that comprises at least one ScFv as defined above.

It also relates to compositions that comprise a nucleic acid or a vector as defined above and a nucleic acid or a vector encoding wild-type p53,  
5 for simultaneous combined use or for combined use that is spaced out over time.

On account of their antiproliferative properties, the pharmaceutical compositions according to the invention are very particularly suitable for treating hyperproliferative disorders such as, in particular, cancers and restenosis. The present invention consequently supplies a particularly efficient method for  
10 destroying cells, in particular hyperproliferative cells.

The invention can be employed in vitro or ex vivo. In this case, it essentially consists in incubating the cells in the presence of one or more nucleic acids (or of a vector or cassette or directly of the ScFv). Doses of from 0.01 to 1000 µg of vector per 10<sup>6</sup> cells, or an MOI of from 0.1 to 1000 for a viral vector  
15 can be employed.

In vivo, it consists in administering to the organism an active quantity of a vector (or of a cassette) according to the invention, preferably directly at the site to be treated (in particular a tumor). In this regard, the invention also relates to a method for destroying hyperproliferative cells, which  
20 method comprises bringing the said cells, or some of these cells, into contact with a nucleic acid as defined above. For an in-vivo use, the nucleic acid or the vector that is employed in the present invention can be formulated with a view to being administered by the topical, oral, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular, transdermal, etc. route. Preferably, the  
25 nucleic acid or the vector is employed in an injectable form. It can therefore be

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

mixed with any excipient that is pharmaceutically acceptable for an injectable formulation, in particular for an injection directly into the site to be treated. The compositions can, in particular, be sterile, isotonic solutions, or dry, in particular lyophilized, compositions that make it possible for injectable solutions to be  
5 constituted by means of the addition of sterilized water or physiological saline, as the case may be. A direct injection of the nucleic acid into the tumor of the patient is advantageous since this makes it possible to concentrate the therapeutic effect at the level of the affected tissues. The doses of nucleic acid employed can be adjusted in accordance with various parameters, particularly in  
10 accordance with the gene, the vector, the mode of administration employed, the pathology concerned or else the desired duration of the treatment. Advantageously, the doses that are administered in vivo are between  $10^6$  and  $10^{10}$  pfu for a viral vector such as an adenovirus. Furthermore, repeated administrations can also be envisaged.

15 Also in vivo, the process and the molecules of the invention can be used to study the mechanisms of action of p53 and to determine the potential of the ScFvs on animal models.

The present invention is advantageously employed in vivo for destroying hyperproliferated cells (i.e. abnormally proliferating cells). It can thus  
20 be applied to the destruction of tumor cells or of smooth muscle cells of the vascular wall (restenosis). It is very particularly appropriate for treating cancers in which a mutant of p53 is observed. By way of example, mention may be made of adenocarcinomas of the colon, cancers of the thyroid, carcinomas of the lung, myeloid leukemia's, colorectal cancers, cancers of the breast, cancers of the  
25 lung, gastric cancers, cancers of the esophagus, B lymphomas, ovarian cancers, cancers of the bladder, glioblastomas, hepatocarcinomas, cancers of the bones, of the skin or of the pancreas, or else cancers of the kidney and of the prostate,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cancers of the esophagus, cancers of the larynx, head and neck cancers, HPV-positive anogenital cancers, EBV-positive cancers of the nasopharynx, cancers in which the cell protein mdm2 is overexpressed, etc.

The present invention is described in more detail in the examples  
 5 that follow, that should be regarded as being illustrative and not limiting.

Figure legends

Figure 1: Strategy for screening the antibodies

Figure 2: Demonstration of the ability of the antibodies to  
 induce gel retardation of p53.

10 Figure 3: Demonstration of the ability of the antibodies to  
 induce gel retardation of p53H273.

Figure 4: Use of ELISA to demonstrate the association of the  
 ScFvs with wild-type p53. Filled circles: IgG 11D3 (1 µg/ml initially); open circles:  
 IgG 421 (1 µg/ml initially); squares: biotinylated polyclonal serum (1 µg/ml  
 15 initially); filled triangles: ScFv 11D3-myc (diluted 1/2 initially); empty triangles:  
 ScFv 421-myc (diluted 1/2 initially); diamonds: irrelevant ScFv (anti-CD3, diluted  
 1/2 initially).

Figure 5: Demonstration of gel retardations induced by the  
 ScFvs

20 Figure 6: Restoration of DNA-binding activity to mutants of  
 p53.

Figure 7: Expression of ScFv421 in H1299 cells

Figure 8: Restoration of the transcriptional activity of mutant  
 H273 in cell line H358.

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Figure 9: Restoration of the transcriptional activity of mutant H273, which is endogenous in cell line HT29.

### Examples

#### 5 EXAMPLE 1: Isolation and screening of the antibody 11D3

This example describes the preparation, isolation and selection of monoclonal antibodies that are directed specifically against the p53 protein, and are able to activate the DNA-binding function of the mutated forms of p53.

##### 10 1.1. Isolation of the proteins used for immunizing the mice and screening of the hybridomas

The wild-type p53 protein, and various proteins, i.e. p53 H273, p53 W248 and p53 G281, corresponding to mutations of the wild-type p53 that are frequently found in tumor cells, were produced in *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells that were infected with a recombinant baculovirus, and were purified  
15 by affinity on an agarose gel to which the polyclonal antibody PAb421 (Leveillard et al., EMBO J. 15, 1615-1623 (1996)) was coupled. The proteins corresponding to fragments 1-320 and 73-320 of the wild-type p53 protein were also produced in *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells that were infected with a recombinant baculovirus by following the instructions provided by the company Invitrogen. The  
20 complementary DNAs that were inserted into the pBlueBacIII transfer plasmid were generated using conventional recombinant DNA techniques as described, for example, by Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch & Maniatis: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

##### 25 1.2. Isolation and screening of the hybridomas

The mice were immunized with an equimolar mixture of the three mutant p53 proteins described above and the hybridomas were

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

isolated by following the procedural protocols described by Harlow and Lane (Harlow & Lane: Antibodies, a Laboratory Manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). Hybridomas producing monoclonal antibodies directed against the above-described mutant p53 proteins were selected by the method of capturing  
5 the antibody produced in the hybridoma culture medium, in wells of 96-well PVC plates, in which a quantity of 1 microgram of the equimolar mixture of the above-described three mutant p53 proteins had previously been immobilized, following the procedural protocols described by Harlow and Lane (Harlow & Lane: Antibodies, a Laboratory Manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). This  
10 first screening resulted in the selection of 317 positive hybridomas. After two weeks of amplifying the hybridomas, the supernatants of the amplified hybridomas were first reevaluated using the above-mentioned antibody capture method (method 1) and were then classified using three screening methods that were in principle identical to that mentioned above apart from the fact that the  
15 nature of the immobilized proteins was different: either the purified wild-type p53 protein (method 2), or a protein extract derived from Sf9 cells that were producing the 1-320 fragment of the wild-type p53 (method 3), or a protein extract derived from Sf9 cells that were producing the 73-393 fragment of the wild-type p53 (method 4) were immobilized in the wells. The protein extracts were  
20 obtained by lysing the Sf9 cells, by means of repeated freezing/thawing in a phosphate buffer, and then ultracentrifuging the cell debris. Of the 317 amplified hybridoma supernatants, 162 no longer responded in method 1. The remaining 155 were all positive in method 2, including 33 (group A) that were negative in methods 3 and 4, 115 (group B) that were positive in method 3 and negative in  
25 method 4, and, finally, 7 (group C) that were positive in both of these methods. The group B supernatants correspond to the supernatants that contain an antibody whose epitope is located in the first 73 amino acids of p53. 77 supernatants of this group were found to be negative in method 2 when they were

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

preincubated with the peptide (1 mg/ml) corresponding to the sequence of the first 40 amino acids of p53. Isotyping of the group A antibodies, the 38 group B antibodies remaining after elimination of the 77 mentioned above, and the group C antibodies enabled us to eliminate the IgMs. These results are summarized in

5 Figure 1.

42 antibodies were then tested for their ability to induce a supershift in a p53/DNA complex. After having been purified on protein A/Sepharose, the antibodies were quantified. Gel retardation experiments were performed by incubating 30 ng of purified wild-type p53 protein with a 32P-  
10 labelled DNA probe representing a specific binding sequence for p53. 300 ng of the various antibodies were then added. The complexes were resolved on acrylamide gel.

The results in Figure 2 demonstrate that 27 of these antibodies were able to induce a supershift. 19 of these 27 were tested by substituting the  
15 His273 mutant for the wild-type p53 protein in the same gel retardation experiment (Figure 3). These 19 antibodies all produced positive results. Antibody No. 26 produced a more pronounced retardation than did the others. This antibody was designated 11D3 and used in the subsequent experiments.

#### EXAMPLE 2: Isolation of the ScFvs 421 and D3M

20 The ScFvs were isolated from hybridomas using conventional molecular biological techniques based on PCRs performed using degenerate primers that were specific for the VH and VL regions. The ScFv that was derived from the antibody 11D3 was designated D3M. Its sequence is depicted in SEQ ID No. 2. The sequence of ScFv421 is depicted in SEQ ID No. 1.

25 EXAMPLE 3: Construction of vectors for expressing the ScFvs

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

This example describes the construction of vectors that can be used for transferring the nucleic acids of the invention in vitro or in vivo.

### 3.1. Construction of plasmid vectors

Two types of vectors were used for constructing plasmid vectors.

- 5           - The vector pSV2, which is described in DNA Cloning, A Practical Approach Vol. 2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. This vector is a eukaryotic expression vector. The nucleic acids encoding the ScFvs were inserted into this vector in the form of HpaI/EcoRV fragments. This placed them under the control of the SV40 virus enhancer promoter. All the  
10 constructs described in Example 2 were introduced into this vector in order to be tested in the different in vitro and in vivo evaluation systems.

- The vector pCDNA3 (Invitrogen). This is also a eukaryotic expression vector. In this vector, the nucleic acids encoding the ScFvs of the invention are thus placed under the control of the CMV early promoter. All the  
15 constructs described in Example 2 were introduced into this vector in the form of a HindIII/NotI fragment.

### 3.2. Construction of viral vectors

- According to a particular embodiment, the invention involves the construction and use of viral vectors that enable the above-defined nucleic acids  
20 to be transferred and to be expressed in vivo.

- More specifically, various adenovirus serotypes, whose structure and properties vary somewhat, were characterized. Of these serotypes, preference is given, within the context of the present invention, to using type 2 or type 5 human adenoviruses (Ad 2 or Ad 5) or adenoviruses of animal origin (see  
25 application WO94/26914).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Those adenoviruses of animal origin that can be used within the context of the present invention and that may be mentioned are the adenoviruses of canine, bovine, murine (example: Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian or simian (example: SAV) origin. The adenovirus of animal origin  
5 is preferably a canine adenovirus, more preferably a CAV2 adenovirus [Manhattan or A26/61 strain (ATCC VR-800), for example]. Adenoviruses of human or canine, or mixed, origin are preferably used within the context of the invention.

Preferably, the defective adenoviruses of the invention comprise  
10 the ITRs, a sequence making encapsidation possible and a nucleic acid according to the invention. Still more preferably, at least the E1 region is non-functional in the genome of the adenoviruses of the invention. The viral gene in question can be rendered non-functional by any technique known to the skilled person, in particular by total deletion, substitution, partial deletion or addition of  
15 one or more bases to the gene or genes in question. Modifications of this nature can be obtained in vitro (on the isolated DNA) or in situ, for example, using genetic engineering techniques or else by treating with mutagenic agents. Other regions can also be modified, in particular the E3 region (WO95/02697), the E2 region (WO94/28938), the E4 region (WO94/28152, WO94/12649,  
20 WO95/02697, WO96/22378) and the L5 region (WO95/02697). According to a preferred embodiment, the adenovirus according to the invention contains a deletion in the E1 and E4 regions. According to another preferred embodiment, it contains a deletion in the E1 region into which are inserted the E4 region and the nucleic acid of the invention (WO96/13596). In the viruses of the invention, the  
25 deletion in the E1 region preferably extends from nucleotide 455 to nucleotide 3329 in the sequence of the Ad5 adenovirus.

The defective recombinant adenoviruses according to the invention can be prepared by any technique known to the skilled person (Levrero

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). In particular, they can be prepared by homologous recombination between an adenovirus and a plasmid carrying, inter alia, the DNA sequence of interest. The homologous recombination takes place after the said adenovirus and plasmid  
5 have been cotransfected into an appropriate cell line. The cell line employed should preferably (i) be transformable by the said elements and (ii) possess the sequences that are able to complement the part of the genome of the defective adenovirus, preferably in an integrated form in order to avoid the risks of recombination. As an example of a cell line, mention may be made of the human  
10 embryonic kidney cell line 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59), which harbors, in particular, integrated into its genome, the left-hand part of the genome of an Ad5 adenovirus (12%) or of cell lines that are able to complement the E1 and E4 functions, as described, in particular, in the applications with the Nos. WO94/26914, WO95/02697 and WO96/22378.

15 The adenoviruses that have multiplied are then recovered and purified using conventional molecular biological techniques, as illustrated in the examples.

The adenoassociated viruses (AAV) are DNA viruses of relatively small size that integrate in a stable and site-specific manner into the genome of  
20 the cells that they infect. They are able to infect a wide spectrum of cells without having any effect on cell growth, morphology or differentiation. Furthermore, they do not appear to be involved in human pathologies. The genome of the AAVs has been cloned, sequenced and characterized. It comprises approximately 4700 bases and contains, at each end, an inverted repeat region (ITR), of about 145  
25 bases, which serves as the origin of replication for the virus. The remainder of the genome is divided into 2 essential regions that carry the encapsidation functions: the left-hand part of the genome, which contains the rep gene involved in viral replication and expression of the viral

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

genes; the right-hand part of the genome, which contains the cap gene that encodes the capsid proteins of the virus.

The use of vectors derived from AAVs for transferring genes in vitro and in vivo has been described in the literature (see, in particular, 5 WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US 5,139,941, EP 488 528). These applications describe various AAV-derived constructs in which the rep and/or cap genes are deleted and replaced with a gene of interest, and the use of these constructs for transferring the said gene of interest in vitro (into cells in culture) or in vivo (directly into an organism). The defective recombinant AAVs according to 10 the invention can be prepared by cotransfecting, into a cell line that is infected with a human helper virus (for example an adenovirus), a plasmid containing a nucleic sequence of the invention of interest, flanked by two AAV inverted repeat regions (ITR) and a plasmid carrying the AAV encapsidation genes (rep and cap genes). An example of a cell line that can be used is cell line 293. The 15 recombinant AAVs produced are then purified by means of conventional techniques.

The construction of recombinant vectors derived from herpes viruses and retroviruses has been amply described in the literature: see, in particular, Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP 178220, 20 Bernstein et al., Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. In particular, the retroviruses are integrating viruses that selectively infect dividing cells. They therefore constitute vectors of interest for applications relating to cancer. The retrovirus genome essentially comprises two LTRs, an encapsidation sequence and three coding regions (gag, pol and env). In 25 retrovirus-derived recombinant vectors, the gag, pol and env genes are generally deleted, in whole or in part, and replaced with a heterologous nucleic acid sequence of interest. These vectors can be constructed from various types of retrovirus such as,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

in particular, MoMuLV (Moloney murine leukemia virus; also termed MoMLV), MSV (Moloney murine sarcoma virus), HaSV (Harvey sarcoma virus); SNV (spleen necrosis virus); RSV (Rous sarcoma virus) or else Friend's virus.

In order to construct recombinant retroviruses according to the invention that contain a nucleic acid according to the invention, a plasmid containing, in particular, the LTRs, the encapsidation sequence and the said nucleic acid is constructed and then used to transfect a cell line, termed an encapsidation cell line, that is able to supply in trans the retroviral functions that are lacking in the plasmid. Generally, the encapsidation cell lines are therefore able to express the gag, pol and env genes. Encapsidation cell lines of this nature have been described in the prior art, particularly the cell line PA317 (US 4,861,719); the cell line PsiCRIP (WO90/02806) and the cell line GP+envAm-12 (WO89/07150). Furthermore, the recombinant retroviruses can contain modifications within the LTRs for suppressing transcriptional activity as well as extensive encapsidation sequences that include a part of the gag gene (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). The recombinant retroviruses produced are then purified by means of conventional techniques.

In order to implement the present invention, it is very particularly advantageous to use an adenovirus or a defective recombinant retrovirus. This is because these vectors possess properties that are particularly favorable for transferring genes into tumor cells.

### 3.3. Chemical vectors

Of the synthetic vectors that have been developed, preference is given, within the context of the invention, to using cationic polymers of the polylysine, (LKLK)<sub>n</sub>, (LKKL)<sub>n</sub> (WO95/21931), polyethylene imine (WO96/02655) and DEAE

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



dextran type or else cationic lipids or lipofectants. They possess the property of condensing the DNA and of promoting its association with the cell membrane. Of these latter, those which may be mentioned are lipopolyamines (lipofectamine and transfectam, WO95/18863 and WO96/17823), various cationic or neutral lipids (DOTMA, DOGS, DOPE, etc.) and also peptides of nuclear origin (WO96/25508). In addition, the concept of receptor-mediated targeted transfection has been developed. This concept takes advantage of the principle of condensing the DNA with the aid of the cationic polymer, while directing binding of the complex to the membrane via a chemical coupling between the cationic polymer and the ligand of a membrane receptor present on the surface of the cell type that it is desired to transfect. Thus, the targeting of the transferrin receptor, the insulin receptor or the asialoglycoprotein receptor of hepatocytes has been described. A composition according to the invention that uses such a chemical vector is prepared by any technique known to the skilled person, generally by simply bringing the different components into contact.

#### EXAMPLE 4: The ScFvs recognize p53

The association of the ScFvs with p53 was verified in an ELISA test.

A myc tag was fused to the ScFvs to enable them to be detected. The ScFvs 421 and 11D3 (D3M), and a control ScFv (anti-CD3), were produced from the periplasms of bacteria expressing these different ScFvs.

ELISA plates coated with purified p53 are incubated with various dilutions of 11D3 IgG, 421 IgG, a biotinylated anti-p53 polyclonal serum, the 11D3 ScFv, the 421 ScFv and the anti-CD3 ScFv.

The two IgGs are then visualized using a secondary anti-IgG antibody coupled to alkaline phosphatase. The biotinylated serum is visualized using extravidin coupled to alkaline phosphatase. The ScFvs are visualized using the anti-myc antibody 9E10 and then using an anti-IgG antibody coupled to

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

alkaline phosphatase. A colorimetric assay of the alkaline phosphatase activity is depicted in Figure 4, showing that the two purified IgGs, the polyclonal serum and the 421 and 11D3 ScFvs recognize p53, while the anti-CD3 ScFv is inactive.

EXAMPLE 5: The ScFvs are able to induce a supershift of the wild-type p53

5                   The ability of the ScFvs to activate the DNA-binding function of the wild-type p53 was tested by means of gel retardation experiments.

                  A DNA duplex representing a specific binding site for p53 was labeled with  $^{32}\text{P}$  and then incubated with the purified wild-type p53 and various purified antibodies or ScFvs produced in bacterial periplasms. The complexes  
10                   are resolved by means of electrophoresis on acrylamide gel.

                  The results obtained are depicted in Figure 5.

                  The DNA/p53 complex is seen in the "basal" lane. The antibodies HR231, pAb421 and 11D3 are able to induce an additional retardation (supershift) and to increase the quantity of DNA/p53 complex.

15                   The 421 and D3M ScFvs are also able to induce a supershift while an anti-ras control ScFv (Y28) has no effect. The 421 ScFv, contrary to the D3M ScFv, induces an increase in the quantity of p53/DNA complex.

EXAMPLE 6: The ScFvs are able to restore a DNA-binding function to a p53 mutant

20                   In an analogous manner, the ScFvs were tested for their ability to restore the DNA-binding function of the inactive mutant Trp248. The results obtained are depicted in Figure 6.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

They demonstrate that the two ScFvs induce the appearance of a retarded band corresponding to a p53/DNA complex.

EXAMPLE 7: The ScFvs are correctly expressed in tumor cells

The expression of the ScFvs was verified by transiently  
5 transfecting expression vectors (SV40 promoter) into H1299 tumor cells. More particularly, the nucleic acids were administered in the form of a plasmid vector of the pSV2 type (Example 3) and in the presence of a cationic lipid, i.e. lipofectamine.

The results obtained are depicted in Figure 7. When a Western  
10 blot is carried out on a total extract, a major band is seen migrating toward 30 kD, which corresponds to the expected size and confirms that the molecules are expressed at significant levels in tumor cells.

EXAMPLE 8: The ScFvs are able partially to restore the transactivating function of the His273 mutants

15 The ability of these ScFvs to exert an effect, within tumor cells, on the deficient transactivating function of the mutated forms of p53 was measured in the following manner:

Transient transfections were carried out in cell lines H358 or H1299 (both cell lines being deleted for p53) or in the cell line HT29 (harboring  
20 the p53 mutant His273). These transfections introduced expression vectors for the wild-type p53 or the mutants H273 or His175, for the two ScFvs, and a reporter plasmid containing the CAT (chloramphenicol acetyl transferase) gene under the control of a p53-dependent promoter. The CAT activity measured 48 h after transfection reflects the transactivating function of p53.

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

The results shown in Figure 8 indicate that, in cell line H358, the two ScFvs are able to effect a significant reactivation of the transcriptional activity of the mutant His273. Identical results were obtained in cell line H1299.

In a similar manner, the two ScFvs are able to increase the  
5 transcriptional activity of the endogenous mutant His273 in cell line HT29 (Figure 9).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



SEQUENCES

SEQ ID No. 1 : Nucleotide and peptide sequences of 421

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

SEQ ID No. 2 : Nucleotide and peptide sequences of D3M

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CLAIMS

1. Process for restoring a p53-dependent transactivation activity in cells exhibiting a mutated p53 protein, comprising the introduction into  
5 the said cell of a single-chain antibody that is able to bind the mutated p53 protein specifically.
2. Process according to Claim 1, comprising the introduction into the said cell of a nucleic acid that comprises a sequence encoding the said single-chain antibody under the control of a promoter that is able to function in  
10 the cell.
3. Process according to Claim 1 or 2, characterized in that the single-chain antibody is able specifically to bind an epitope present in the C-terminal region of p53, and which carries the oligomerization domain and the regulatory domain.
- 15 4. Process according to Claim 3, characterized in that the single-chain antibody is able specifically to bind an epitope present in the C-terminal region of p53 between residues 320-393.
5. Process according to Claim 3, characterized in that the single-chain antibody is selected from ScFv421, having the sequence SEQ ID  
20 No. 1, and 11D3, having the sequence SEQ ID No. 2.
6. Process according to Claim 2, characterized in that the nucleic acid is part of a vector.
7. Process according to Claim 6, characterized in that the vector is a viral vector.
- 25 8. Process according to Claim 7, characterized in that the vector is a defective recombinant adenovirus.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9. Process according to Claim 7, characterized in that the vector is a defective recombinant retrovirus.

10. Process according to Claim 7, characterized in that the vector is a defective recombinant AAV.

5 11. Process according to Claim 7, characterized in that the vector is a defective recombinant HSV.

12. Process according to Claim 6, characterized in that the vector is a chemical or biochemical vector.

10 13. Process according to Claim 1 or 2, characterized in that the mutated p53 protein is devoid of tumor-suppressing activity.

14. Process according to Claim 13, characterized in that the mutated p53 protein is a form that is present in tumor cells.

15 15. Process according to Claim 14, characterized in that the mutated p53 protein is selected from among the proteins p53H273, p53W248 and p53G281.

16. Process according to Claim 1 or 2, characterized in that the cell exhibiting a mutated p53 protein is a tumor cell.

17. Process according to Claim 16, characterized in that the tumor cell is a cell of a lung, colon, head and neck, hepatic or brain tumor.

20 18. Use of a single-chain antibody that is able to bind a p53 protein specifically for modifying the conformation of the said mutated p53 protein.

19. Use of a single-chain antibody that is able to bind a mutated p53 protein specifically for preparing a pharmaceutical

25

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



composition intended for treating hyperproliferative disorders in which a mutated p53 protein is involved.

20. Use of a nucleic acid encoding a single-chain antibody that is able to bind a mutated p53 protein specifically for preparing a pharmaceutical composition intended for treating hyperproliferative disorders in which a mutated p53 protein is involved.

21. The molecule 11D3, or a variant that recognizes the same epitope or has an improved affinity.

22. Nucleic acid encoding a molecule according to Claim 21.

10 23. Nucleic acid according to Claim 22, characterized in that it is a cDNA, an RNA or a synthetic or semi-synthetic acid.

24. Nucleic acid according to Claim 23, characterized by the sequence SEQ ID No. 2.

15 25. Composition comprising a nucleic acid according to Claim 22.

26. Composition comprising a molecule according to Claim 21.

27. Pharmaceutical composition comprising a nucleic acid according to Claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient, for treating hyperproliferative disorders.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**SECONDARY SCREENINGS****→ Mapping N-terminal / central / C-terminal****ELISA 1-320 / 73-320**

WT	-	+	+	+
1-320	-	-	+	+
73-320	-	-	-	+
	lost	C-ter	N-ter	central
	162	33	115	7

**→ Selection of N-terminal antibodies**

ELISA WT + displacement by peptides 1-40 / 34-73  
 77 antibodies displaced by 1-40  
 27 antibodies displaced by 34-73  
 11 antibodies not displaced

**→ Elimination of the IgGs**

Isotyping

Figure 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	42	27	12
	41	26	11
	40	25	10
	39	24	9
	38	23	8
	37	22	7
	36	21	6
	35	20	5
	34	19	4
	33	18	3
	32	17	2
	31	16	1
	30	15	cont.
	29	14	basal
	28	13	pAM21

Figure 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

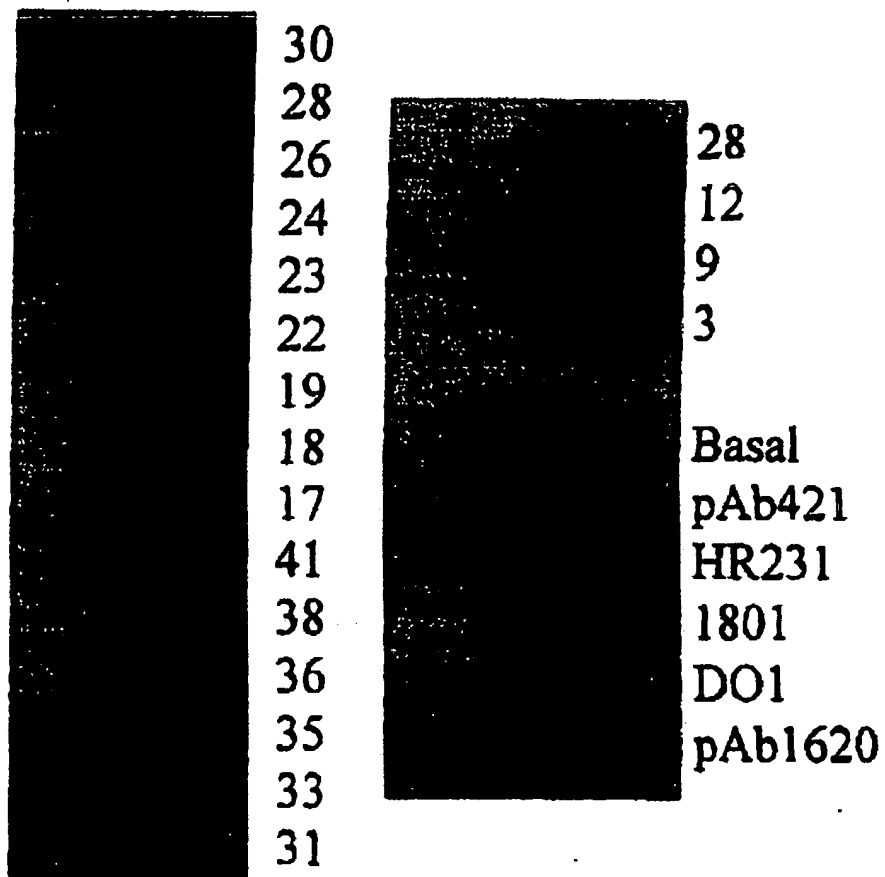


Figure 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



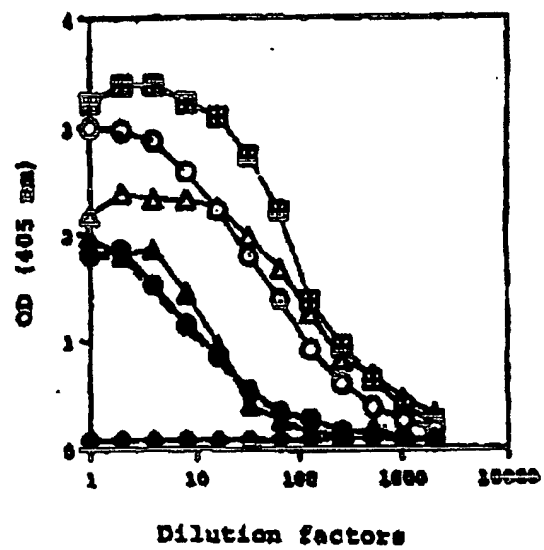
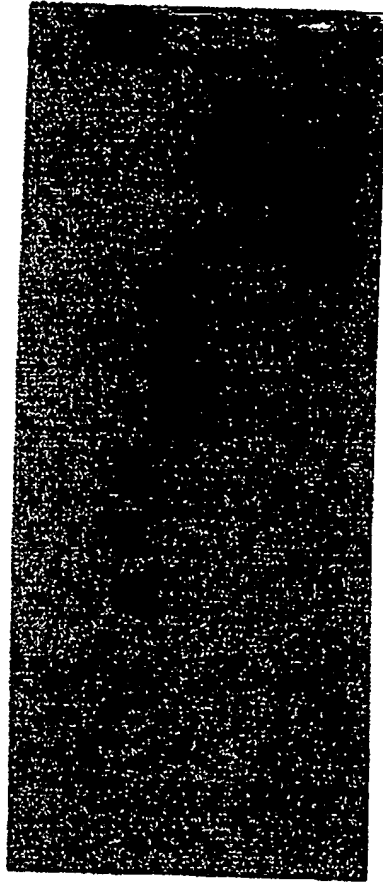


Figure 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Basal  
+ HR231  
+ pAb421  
+ 11D3  
+ ScFv421 (2)  
+ ScFv421 (5)  
+ ScFv421 (10)  
+ ScFvD3M (2)  
+ ScFvD3M (5)  
+ ScFvD3M (10)  
+ ScFvY28 (2)  
+ ScFvY28 (5)  
+ ScFvY28 (10)

Figure 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

p53/PNA/antibody  
complex



p53 Trp248 alone	
p53 Trp248 + purified Fab421	
p53 Trp248 + purified M2331	
p53 Trp248 + purified Fab1001	
p53 Trp248 + unpurified Fab421	
p53 Trp248 +	10μl
p53 Trp248 + ScFv 11D1	3μl
p53 Trp248 +	2μl
p53 Trp248 +	10μl
p53 Trp248 + ScFv 421	3μl
p53 Trp248 +	2μl
p53 Trp248 +	10μl
p53 Trp248 + ScFv control	3μl
p53 Trp248 +	2μl
p53 Trp248 +	20μl
p53 Trp248 + Paripolam alone	3μl
p53 Trp248 +	2μl

Figure 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

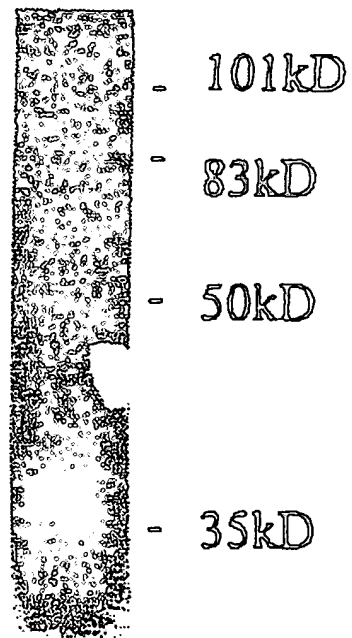


Figure 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



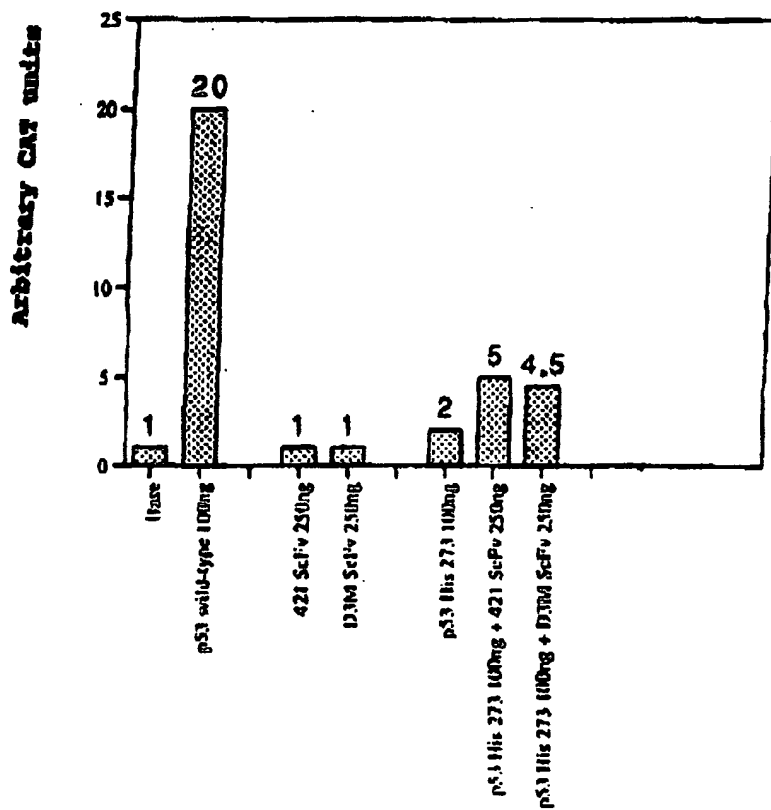


Figure 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

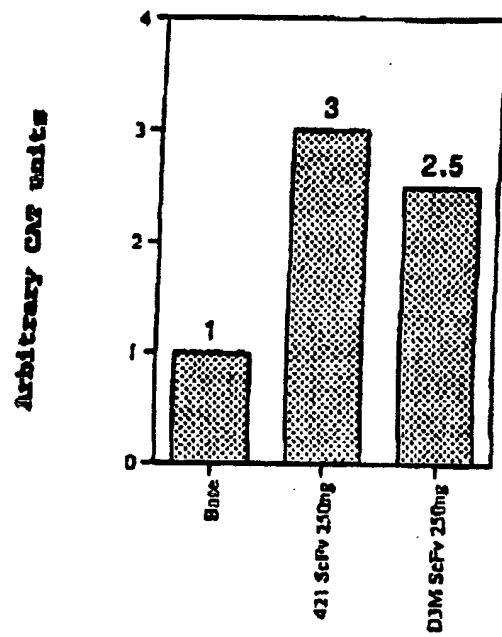
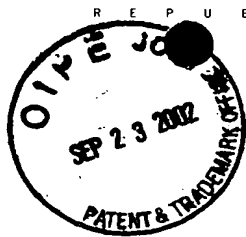


Figure 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



RHDOVE - BOULENC RORLO  
S.A  
#20  
(3)

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

RECEIVED

SEP 26 2002

TECH CENTER 1600/2900

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **14 JAN. 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



# REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN  
TITRE DE PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE \*

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la demande initiale

## 2. OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT  
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÉRÉ  
DU RAPPORT DE RECHERCHE :

☐ OUI  
☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET  
SI LE DEMANDEUR EST UNE  
PERSONNE PHYSIQUE IL  
REQUIERT LE PAIEMENT  
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE  
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI  
☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

29 Oct-96

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 13 176

DATE DE DÉPÔT

29 OCT. 1996

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

1er janvier 1994

## 3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

RHONE-POULENC RORER S.A  
Direction Brevets  
20 avenue Raymond Aron  
92165 ANTONY CEDEX

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST 96030

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

01 55 71 70 36

## 7 TITRE DE L'INVENTION

FRAGMENTS D'ANTICORPS A CHAÎNE UNIQUE ANTI-P53 ET UTILISATION

## 8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

3 0 4 4 6 3 2 8 4

RHONE-POULENC RORER S.A

## 9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20 avenue Raymond Aron  
92160 ANTONY

PAYS

FRANCE

## 10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

## 11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE  
INVENTEUR :

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

## 12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE  
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL  
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION  
DES REDEVANCES :

☐ OUI

☒ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ  
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE  
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE  
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

## 14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA  
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
RHONE-POULENC RORER S.A.

Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9613176

ST 96030

**TITRE DE L'INVENTION :**

FRAGMENTS D'ANTICORPS A CHAÎNE UNIQUE ANTI-P53 ET UTILISATIONS

**LE (S) SOUSSIGNÉ (S)**

RHONE-POULENC RORER S.A  
20 avenue Raymond Aron  
92160 ANTONY

**DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BRACCO Laurent - 12 rue Moulin des Prés - 75013 PARIS (FRANCE)

DEBUSSCHE Laurent - 112 avenue Jean Jaurès - 91200 ATHIS-MONS  
(FRANCE)

**NOTA** : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 29 octobre 1996

**RHONE-POULENC RORER S.A.**  
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER



**FRAGMENTS D'ANTICORPS A CHAINE UNIQUE ANTI-P53****ET UTILISATIONS**

La présente invention concerne un procédé pour restaurer dans des cellules présentant une protéine p53 mutée, dépourvue ou diminuée de sa fonction de facteur transcriptionnel, une activité de transactivation p53-dépendante. Plus particulièrement, le procédé de l'invention repose sur l'utilisation d'anticorps simple chaîne capables de lier spécifiquement la protéine p53 mutée. Elle concerne également de nouvelles molécules capables de lier spécifiquement et efficacement les protéines p53, et permettant en outre de restaurer une activité p53 dans des cellules tumorales, ainsi que les acides nucléiques codant pour ces molécules et les vecteurs les contenant. Ce procédé et les molécules de l'invention sont utilisables in vitro ou ex vivo pour étudier le mécanisme d'action de p53 et de ses formes mutées ou pour purifier les protéines p53. Ils présentent également des utilisations in vivo, notamment dans des approches thérapeutiques de restauration d'activité p53 dans des contextes pathologiques tels que notamment les cancers.

La protéine p53 sauvage intervient dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. Cette protéine, dont la fonction principale est d'être un activateur de la transcription de certains gènes, est susceptible, par un processus non encore bien défini, de bloquer la cellule en phase G1 du cycle cellulaire lors de l'apparition de mutations au cours de la réplication du génome, et d'enclencher un certains nombre de processus de réparation de l'ADN. De plus, en cas de mauvais fonctionnement de ces processus de réparation ou en cas d'apparition d'évènements mutationnels trop nombreux pour être corrigés, cette protéine est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée, appelé apoptose. De cette façon, la protéine p53 agit comme un supresseur de

tumeur, en éliminant les cellules anormalement différenciées ou dont le génome a été endommagé.

Cette principale fonction de la p53 dépend de sa fonction de facteur de transcription, soit en d'autre termes de sa double capacité à reconnaître des séquences spécifiques au niveau de l'ADN génomique et à recruter la machinerie générale de transcription.

La protéine p53 comporte 393 acides aminés, qui définissent 5 domaines fonctionnels :

- le domaine activateur de la transcription, constitué par les acides aminés 1 à 73, capable de lier certains facteurs de la machinerie générale de transcription comme la protéine TBP. Ce domaine est aussi le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Il est également le siège d'interactions nombreuses de la protéine p53 avec de nombreuses autres protéines et notamment avec la protéine cellulaire mdm2 ou la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr (EBV), capables de bloquer la fonction de la protéine sauvage. De plus, ce domaine possède des séquences d'acides aminés dites PEST de susceptibilité à la dégradation protéolytique.

- le domaine de liaison à l'ADN, localisé entre les acides aminés 73 et 315. La conformation de ce domaine central de p53 régule la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques de la protéine p53. Ce domaine est le siège de deux types d'altérations affectant la fonction de la protéine sauvage :

- (i) l'interaction avec des protéines bloquant la fonction de la p53 comme l'antigène 'grand T' du virus SV40 ou les protéines virales E6 des virus HPV16 et HPV18 capables de provoquer sa dégradation par le système de l'ubiquitine. Cette dernière interaction ne peut se faire qu'en présence de la protéine cellulaire E6ap (enzyme E3 de la cascade de l'ubiquitination).

(ii) les mutations ponctuelles qui affectent la fonction de la p53 et dont la quasi-totalité sont localisées dans cette région.

5       - le signal de localisation nucléaire, constitué des acides aminés 315 à 325, indispensable au bon adressage de la protéine dans le compartiment où elle va exercer sa principale fonction.

10       - le domaine d'oligomérisation, constitué des acides aminés 325 à 355. Cette région 325 à 355 forme une structure de type; feuillet  $\beta$  (326-334)-coude (335-336)-hélice  $\alpha$  (337-355). Les altérations de fonctions localisées dans cette région sont essentiellement dues à l'interaction de la protéine sauvage avec les différentes formes mutantes qui peuvent conduire à des effets variables sur la fonction de la protéine sauvage.

15       - le domaine de régulation, constitué des acides aminés 365 à 393, qui est le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations, fixation d'ARN,...) qui modulent la fonction de la protéine p53 de façon positive ou négative. Ce domaine joue un rôle extrêmement important dans la modulation de l'activité de la protéine sauvage.

Le fonctionnement de la protéine p53 peut être perturbé de différentes façons.

20       - blocage de sa fonction par un certain nombre de facteurs comme par exemple l'antigène 'grand T' du virus SV40, la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr, ou la protéine cellulaire mdm2.

25       - déstabilisation de la protéine par augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par interaction avec la protéine E6 des virus du papillome humain HPV16 et HPV18, qui favorise l'entrée de la p53 dans le cycle d'ubiquitination. Dans ce cas l'interaction entre ces deux

protéines ne peut se faire que par la fixation préalable d'une protéine cellulaire, la protéine E6ap dont le site de fixation est mal connu.

- mutations ponctuelles au niveau du gène de la p53.
- délétion d'un ou des deux allèles de la p53

5 Les deux derniers types de modifications sont retrouvés dans environ 50% des différents types de cancer. A cet égard, les mutations du gène de la p53 repertoriées dans les cellules cancéreuses touchent une très grande partie du gène codant pour cette protéine, et ont pour résultats des modifications variables du fonctionnement de cette protéine. On peut  
10 cependant noter que ces mutations sont en grande majorité localisées dans la partie centrale de la protéine p53 dont on sait qu'elle est la région de contact avec les séquences génomiques spécifiques de la protéine p53. Ceci explique pourquoi la plupart des mutants de la protéine p53 ont comme principale caractéristique de ne plus pouvoir se fixer aux séquences d'ADN  
15 que reconnaît la protéine sauvage et ainsi de ne plus pouvoir exercer leur rôle de facteur de transcription. Par ailleurs, certains mutants semblent avoir acquis de nouvelles fonctions telles que l'activation de certains gènes au niveau transcriptionnel.

20 On regroupe actuellement l'ensemble de ces modifications dans trois catégories:

- les mutants dits faibles, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles, n'affecte pas le fonctionnement de la protéine sauvage codée par l'autre allèle. Les principaux représentants de cette catégorie sont les mutants H273  
25 et W248, ce dernier étant spécifique du syndrome familial de Li-Fraumeni d'hypersensibilité aux affections cancéreuses.

- les mutants dominant-négatifs, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles et par interaction avec la protéine sauvage, est capable de bloquer le fonctionnement de celle-ci par formation d'oligomères mixtes non-actifs qui ne peuvent plus se fixer aux séquences d'ADN spécifiques de la protéine sauvage. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant G281.

- les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui est capable d'une part de bloquer la fonction de la protéine sauvage comme les mutants de la catégorie précédente, et d'autre part, de favoriser par des mécanismes mal connus le développement tumoral, présentant ainsi un gain de fonction. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant H175.

Compte tenu de ses propriétés anti-tumorales et apoptotiques et de son implication dans nombreuses pathologies de type hyperprolifératives, le gène p53 sauvage a été utilisé dans des approches de thérapie génique et cellulaire. Il a en particulier été proposé de traiter certaines pathologies hyperprolifératives, et notamment des cancers, par administration in vivo du gène p53 sauvage, par restauration des fonctions de p53. L'administration peut être réalisée préférentiellement par des vecteurs viraux et notamment adénoviraux (WO94/24297) ou rétroviraux (WO94/06910). Il a ainsi été montré que l'introduction d'un acide nucléique codant pour la protéine p53 sauvage permettait de restaurer partiellement une régulation normale de la croissance cellulaire (Roth et al., Nature Medicine 2 (1996) 985). Des stratégies alternatives basées sur l'emploi de molécules chimères ayant des propriétés de type p53 ont également été développées (PCT/FR96/01111).

Une autre approche pour restaurer les fonctions de la protéine p53 sauvage est basée sur la réversion des protéines mutées endogènes vers un phénotype sauvage, c'est-à-dire présentant les propriétés suppresseur de tumeur et apoptotiques de la p53 sauvage. Cette approche découle de la

mise en évidence que les pertes de fonction des mutants de p53 sont dues à un changement conformationnel de la protéine induit par la/les mutations. A cet égard, la demande WO94/12202 montre qu'un anticorps monoclonal particulier, désigné pAb421, dirigé contre la protéine p53, est capable de restaurer à une certaine classe de mutants fréquemment représentés dans les cancers humains la fonction de liaison à l'ADN in vitro. L'utilisation de ce type de composés présente cependant des inconvénients importants, liés notamment à la quantité élevée d'anticorps nécessaire (et donc aux problèmes de production/purification associés) et à leur faible pénétration intracellulaire.

La présente demande décrit une approche plus performante pour restaurer les propriétés sauvage d'un mutant de la protéine p53. La présente demande décrit en particulier la construction de ligands particulièrement spécifiques de la protéine p53, ayant des propriétés avantageuses de restauration des fonctions p53 sauvage. Plus particulièrement, la présente demande décrit la construction d'anticorps simple chaîne (ScFv) spécifiques de la protéine p53, et notamment la molécule 11D3. La présente demande montre en outre que les ScFv sont capables de reconnaître p53, d'être exprimés efficacement au sein d'une cellule tumorale et de réactiver une partie de la fonction transactivatrice d'une certaine classe de mutants de p53.

Par rapport aux méthodes de l'art antérieur, cette molécule présente des avantages importants et notamment la possibilité d'être exprimée in situ dans une cellule tumorale, en quantités importantes. Les résultats présentés ci-après sont d'autant plus inattendus que des pertes d'affinité avaient souvent été observées entre un anticorps classique et un ScFv. En outre, la demanderesse a montré qu'il est possible d'exprimer les ScFv dans les compartiments intracellulaires appropriés, permettant d'obtenir une activité biologique optimale.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un procédé pour restaurer dans des cellules présentant une protéine p53 mutée une activité de transactivation p53-dépendante comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement la protéine p53 mutée. Avantageusement, le procédé de l'invention comprend l'introduction dans la cellule d'un acide nucléique comprenant une séquence codant pour ledit anticorps simple chaîne sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans la cellule. Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour modifier la conformation de ladite protéine. L'invention concerne également l'utilisation d'un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des désordres hyperprolifératifs dans lesquels une protéine p53 mutée est impliquée, ainsi que l'utilisation d'un acide nucléique codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des désordres hyperprolifératifs dans lesquels une protéine p53 mutée est impliquée.

Le procédé de l'invention repose donc en partie sur la construction, la vectorisation et l'introduction dans des cellules d'anticorps simple chaîne capables de lier spécifiquement une protéine p53 mutée. Les anticorps simple-chaîne (ScFv) sont constitués essentiellement d'une région VH liée à une région VL par un bras. La construction de ScFv et des séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps modifiés a été décrite par exemple dans le brevet US4,946,778 ou dans les demandes WO94/02610, WO94/29446 incorporées à la présente par référence.

La présente demande décrit plus particulièrement la création d'une banque d'hybridomes produisant des anticorps dirigés contre p53, et la construction, à partir de cette banque, de ScFv correspondants. Elle décrit

également le clonage des acides nucléiques correspondants dans des vecteurs d'expression et leur transfert dans des cellules. Elle montre également que ce transfert permet, in vivo, de restaurer efficacement l'activité de liaison à l'ADN de mutants de p53, ainsi que leur activité de  
5 transactivateur.

Plus particulièrement, le procédé de l'invention met en oeuvre des ScFv capables de lier spécifiquement un épitope présent dans la région C-terminale de p53, qui porte le domaine d'oligomérisation et le domaine de régulation. A cet égard, la présente demande décrit également un test  
10 permettant de sélectionner les ScFv possédant cette propriété, par technique ELISA.

Encore plus préférentiellement, les ScFv utilisés dans le procédé de l'invention sont capables de lier spécifiquement un épitope présent dans la région C-terminale de p53 comprise entre les résidus 320-393. A cet égard,  
15 la demande décrit à titre d'exemple particulier la construction et l'expression du ScFv ScFv421 de séquence SEQ ID n° 1 et du 11D3 de séquence SEQ ID n° 2.

Le procédé de l'invention est applicable généralement aux protéines p53 mutées ayant perdu, totalement ou partiellement, la capacité de lier  
20 l'ADN, et le procédé de l'invention permet de restaurer cette capacité. Plus particulièrement, le procédé de l'invention est applicable aux protéines p53 mutées ayant perdu, totalement ou partiellement, la fonction de facteur transcriptionnel de p53 et il permet de restaurer cette fonction. Le niveau de restauration peut être total ou partiel. Avantageusement, il est suffisant pour  
25 permettre au mutant d'exercer une fonction de suppresseur de tumeur, par blocage du cycle cellulaire et/ou par induction d'apoptose. Le procédé de l'invention permet donc de restaurer, au moins partiellement, une activité suppresseur de tumeur dans des cellules présentant des protéines p53 mutées endogènes dépourvues de cette activité. Avantageusement, il s'agit



de protéines mutées présentes dans les cellules tumorales. Comme indiqué ci-avant, différentes formes mutées de la protéine p53 ont été mises en évidence dans les cellules tumorales. On peut citer par exemple les protéines p53H273, p53W248 et p53G281. Les exemples présentés ci-après

5 montrent en particulier que le procédé de l'invention permet de modifier la conformation, et les propriétés biologiques de ces mutants, in vitro et in vivo. En particulier, ces exemples démontrent que les ScFv 421 et 11D3 sont capables de restaurer aux mutants 273 et 248 la capacité de lier spécifiquement l'ADN, et d'induire la transactivation p53 dépendante.

10 Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre in vitro, ex vivo ou in vivo. In vitro ou ex vivo le procédé et les molécules de l'invention peuvent permettre par exemple d'étudier le mécanisme d'action de p53 et de ses formes mutées. En outre, les molécules de l'invention peuvent être utilisées

15 pour la détection ou la purification de protéines p53, par exemple par couplage sur un support, mise en contact avec une solution contenant des protéines p53, suivie éventuellement d'une révélation des complexes formés ou d'une élution. In vivo, notamment chez l'homme, ils peuvent permettre, dans des contextes pathologiques tels que les désordres hyperprolifératifs dans lesquels une déficience en activité p53 est observée, de restaurer cette

20 fonction. A cet égard, il peut être utilisé en association avec d'autres approches évoquées ci-avant (introduction d'un gène p53 sauvage) ou également en association avec une chimiothérapie (WO96/22101). Toujours in vivo, le procédé et les molécules de l'invention sont utilisables chez l'animal, par exemple pour déterminer les niveaux d'expression des ScFv, et

25 évaluer la possibilité d'une approche thérapeutique humaine.

Avantageusement, la cellule présentant une protéine p53 mutée est une cellule tumorale mammifère. A cet égard, on peut citer plus particulièrement les cellules des cancers du poumon (notamment non à petites cellules), du colon, du foie, du cerveau, tête et cou et, plus

30 généralement, tout cancer dans lesquels une forme mutée de la protéine p53

est observée. Avantageusement, il s'agit d'une cellule tumorale humaine dans laquelle un mutant p53H273, p53W248 et/ou p53G281 est observé (poumon, colon, cerveau, tête et cou, foie). L'applicabilité du procédé de l'invention à une cellule particulière peut être déterminée aisément selon la

5 méthodologie suivante : La cellule est tout d'abord caractérisée pour la présence d'une protéine p53 mutée. Cette protéine est ensuite caractérisée pour déterminer la nature de la mutation. S'il s'agit d'une mutation connue, et notamment répertoriée ci-dessus, la cellule peut être considérée comme susceptible de traitement par le procédé de l'invention. S'il s'agit d'une

10 mutation non-répertoriée, différentes approches sont possibles. La protéine mutée peut tout d'abord être isolée (ou synthétisée artificiellement) et testée comme décrit dans les exemples pour son comportement in vitro et in vivo en présence de ScFv. Ceci permet d'identifier le ScFv approprié pour restaurer les fonctions déficientes de cette protéine. Une autre approche consiste à

15 tester directement les ScFv sur une culture de cellules, pour déterminer l'efficacité biologique des ScFv.

Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, le ScFv est avantageusement introduit dans la cellule, in vitro, ex vivo ou in vivo sous forme d'un vecteur portant un acide nucléique codant pour ledit ScFv sous

20 contrôle d'un promoteur fonctionnel dans ladite cellule.

Le promoteur est avantageusement choisi parmi les promoteurs fonctionnels dans les cellules mammifères, de préférence humaines. Plus préférentiellement, il s'agit d'un promoteur permettant l'expression d'un acide nucléique dans une cellule hyperproliférative (cancéreuse, resténose, etc). A

25 cet égard, différents promoteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir par exemple du propre promoteur du gène p53. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Il peut ainsi s'agir de tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique

30 ou non, inductible ou non, forte ou faible. On peut citer notamment les

séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK,  $\alpha$ -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoA1, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras,  $\alpha$ -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

Comme indiqué ci-avant, la présente demande décrit également de nouvelles molécules ayant des propriétés de liaison et de reversion de protéines p53 mutées, particulièrement avantageuses. L'invention décrit plus précisément la construction, la vectorisation et le transfert dans des cellules de ScFv particuliers (11D3, 421). La séquence nucléique et peptidique de ces ScFv est indiquée SEQ ID n° 1 et 2. Les exemples qui suivent montrent la capacité particulièrement avantageuse de ces molécules (i) de lier spécifiquement les protéines p53 mutées, dans la région C-terminale, (ii) de rendre à ces protéines mutées la capacité de lier l'ADN, et (iii) de rendre à ces protéines la capacité d'activer la transcription. Les exemples montrent en outre que ces molécules sont correctement exprimées dans les cellules tumorales, ce qui permet leur utilisation avantageuse dans des contextes de désordres hyperprolifératifs. Par ailleurs, les propriétés des ScFv de

l'invention peuvent également être améliorées. Notamment, il est connu que l'affinité des ScFv est influencée par les régions CDR (soulignées sur la séquence) et peut être améliorée par des expériences routinières de mutagénèse/sélection. Ainsi, la mutagénèse sur des anticorps a été par exemple décrite par Marks et coll. (Bio/Technology, 10, 779-783, 1992) et par Winter G. et Milstein C. (Nature, 349,293-299, 1991). Les technologies décrites dans ces références peuvent être appliquées à la préparation de variants des ScFv ayant une affinité modifiée selon l'invention. La sélection peut ensuite être faite dans les conditions décrites dans les exemples.

- 10 L'invention a donc en outre pour objet la molécule 11D3 dont la séquence peptidique est présentée SEQ ID n°2, ainsi que tout variant présentant une modification dans les régions CDR, conservant la capacité de lier les protéines p53. La modification peut consister en une délétion, une substitution ou une insertion d'un ou plusieurs résidus dans les régions CDR.
- 15 Avantageusement, la modification porte sur moins de 10 résidus.

La présente invention a également pour objet tout acide nucléique codant pour le ScFv 11D3 ou un variant tel que défini ci-avant.

- L'acide nucléique selon l'invention peut être un acide ribonucléique (ARN) ou désoxyribonucléique (ADN). Avantageusement, il s'agit d'un ADN complémentaire (ADNc). Il peut être d'origine humaine, animale, virale, synthétique ou semi-synthétique. Il peut être obtenu de différentes manières et notamment par synthèse chimique en utilisant les séquences présentées dans la demande et par exemple un synthétiseur d'acides nucléiques. Il peut également être obtenu par criblage de banques au moyen de sondes spécifiques, notamment telles que décrites dans la demande. Il peut encore être obtenu par des techniques mixtes incluant la modification chimique (élongation, délétion, substitution, etc) de séquences criblées à partir de banques. D'une manière générale, les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute
- 20
- 25

technique connue de l'homme du métier (voir notamment les technologies décrites dans les brevets US4,946,778 et WO94/02610, incorporés à la présente par référence. Une stratégie classique de construction d'acides nucléiques codant pour un ScFv est la suivante : Les cDNA codant pour les régions VH et VL sont obtenus à partir de l'hybridome produisant l'anticorps anti-p53 choisi. Pour cela, les ARN totaux de l'hybridome sont extraits et soumis à une réaction de transcription inverse en utilisant des hexamères random comme amorces. L'utilisation de ce type d'amorce permet d'éviter l'emploi d'amorces spécifiques des immunoglobulines. Les clones d'ADNc obtenus ont une longueur suffisante pour cloner les régions V. Lorsqu'ils représentent une trop faible fraction des cDNA totaux présents, une réaction préalable d'amplification peut être réalisée pour produire suffisamment de DNA pour le clonage. Pour cela, les ADNc codant pour les régions VH et VL sont amplifiés séparément. Les amorces utilisées sont des oligonucléotides hybridant au niveau des extrémités opposées des régions variables de chaque chaîne (H et L). Le produit d'amplification utilisant les amorces spécifiques des chaînes lourdes et le produit d'amplification utilisant les amorces spécifiques des chaînes légères sont ensuite purifiés. Après purification, les ADNc codant pour les régions VH et VL de l'anticorps sont assemblés en une chaîne unique au moyen d'un bras nucléotidique (L). Le bras nucléotidique a été construit de telle sorte que l'une des extrémités se lie à l'extrémité 3' de l'ADNc codant pour la région VH et l'autre à l'extrémité 5' de l'ADNc codant pour la région VL. La séquence du bras code pour le peptide (G4S)<sub>3</sub>. La séquence assemblée, de 700 pb environ, contient sous forme d'un fragment NcoI-NotI, l'enchaînement VH-L-VL dont les séquences sont représentées SEQ ID n° 1 et 2 par exemple.

Préférentiellement, l'acide nucléique selon l'invention est un ADNc ou un ARN.

L'acide nucléique selon l'invention est avantageusement choisi parmi :

(a) tout ou partie de la séquence SEQ ID n° 2 ou de son brin complémentaire,

5           (b) toute séquence hybridant avec les séquences (a) et codant pour un ScFv capable de lier spécifiquement la protéine p53, de préférence au niveau de la région C-terminale,

(c) les variants de (a) et (b) résultant de la dégénérescence du code génétique.

10           La présente invention concerne également toute cassette d'expression comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant, un promoteur permettant son expression et un signal de terminaison de la transcription.

15           Dans le procédé de l'invention, l'acide est avantageusement introduit dans les cellules au moyen d'un vecteur d'administration, qui permet d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage et/ou (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

20           Dans un mode de mise en oeuvre particulièrement préféré de la présente invention l'acide nucléique est incorporé dans un vecteur qui peut être d'origine chimique (liposome, nanoparticule, complexe peptidique, lipides ou polymères cationiques, etc) virale (rétrovirus, Adénovirus, virus de l'herpès, AAV, virus de la vaccine, etc) ou plasmidique.

25           L'utilisation de vecteurs viraux repose sur les propriétés naturelles de transfection des virus. Il est ainsi possible d'utiliser par exemple les adénovirus, les herpès virus, les rétrovirus et les virus adéno associés. Ces vecteurs s'avèrent particulièrement performants sur le plan de la transfection.

En particulier, la capacité des adénovirus et des rétrovirus à infecter les cellules tumorales en font des vecteurs de choix dans le cadre de l'invention. A cet égard, dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'acide nucléique est introduit sous forme d'un vecteur rétroviral, c'est-à-dire d'un rétrovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique codant pour un ScFv tel que défini ci-avant. Dans un autre mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, l'acide nucléique est introduit sous forme d'un vecteur adénoviral, c'est-à-dire d'un adénovirus recombinant défectif dont le génome comprend un acide nucléique codant pour un ScFv tel que défini ci-avant.

Le vecteur selon l'invention peut également être un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques, synthétiques ou naturels, représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transfecter. Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques. Dans un procédé particulier selon l'invention, le vecteur est un vecteur chimique ou biochimique.

L'invention concerne également toute composition comprenant au moins un acide nucléique tel que défini ci-avant.

Elle concerne également toute composition comprenant au moins un vecteur tel que défini ci-avant.

Elle concerne aussi toute composition comprenant au moins un ScFv tel que défini ci-avant.

Elle concerne également des compositions comprenant un acide nucléique ou un vecteur tel que défini ci-avant et un acide nucléique ou un vecteur codant pour la p53 sauvage, pour une utilisation combinée  
5 simultanée ou espacée dans le temps.

En raison de leurs propriétés antiprolifératives, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont tout particulièrement adaptées pour le traitement des désordres hyperprolifératifs, tels que notamment les  
10 cancers et la resténose. La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement efficace pour la destruction de cellules, notamment de cellules hyperprolifératives.

Elle peut être utilisée in vitro ou ex vivo. Dans ce cas, elle consiste essentiellement à incuber les cellules en présence d'un ou plusieurs  
15 acides nucléiques (ou d'un vecteur, ou cassette ou directement du ScFv). Des doses de 0.01 à 1000 µg de vecteur pour  $10^6$  cellules, ou une MOI de 0,1 à 1000 pour un vecteur viral peuvent être utilisées.

In vivo, elle consiste à administrer à l'organisme une quantité active d'un vecteur (ou d'une cassette) selon l'invention, de préférence  
20 directement au niveau du site à traiter (tumeur notamment). A cet égard, l'invention a également pour objet une méthode de destruction de cellules hyperprolifératives comprenant la mise en contact desdites cellules ou d'une partie d'entre-elles avec un acide nucléique tel que défini ci-avant. Pour une utilisation in vivo, l'acide nucléique ou le vecteur utilisé dans la  
25 présente invention peut être formulé en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, l'acide nucléique ou le vecteur est utilisé sous une forme injectable. Il peut donc



être mélangé à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition  
5 selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Une injection directe de l'acide nucléique dans la tumeur du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses d'acide nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents  
10 paramètres, et notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. Avantagusement, les doses administrées in vivo sont comprises entre  $10^6$  et  $10^{10}$  pfu pour un vecteur viral tel qu'un adénovirus. Par ailleurs, des administrations répétées peuvent également  
15 être envisagées.

Toujours in vivo, le procédé et les molécules de l'invention peuvent être utilisées pour étudier les mécanismes d'action de p53, et pour déterminer le potentiel des ScFv sur des modèles animaux.

La présente invention est avantagusement utilisée in vivo pour la  
20 destruction de cellules en hyperprolifération (i.e. en prolifération anormale). Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose). Elle est tout particulièrement appropriée au traitement des cancers dans lesquels un mutant de p53 est observé. A titre d'exemple, on peut citer les  
25 adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, les hépatocarcinomes, les cancers des os, de la  
30 peau, du pancréas ou encore les cancers du rein et de la prostate, les

cancers de l'oesophage, les cancers du larynx, les cancers tête et cou, les cancers ano-génitaux HPV positifs, les cancers du nasopharynx EBV positifs, les cancers dans lesquels la protéine cellulaire mdm2 est surexprimée, etc.

- 5            La présente invention est décrite plus en détail dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### **Légende des Figures**

Figure 1 : Stratégie de criblage des anticorps

- 10            Figure 2 : Mise en évidence de la capacité des anticorps à induire un retard sur gel de p53.

Figure 3 : Mise en évidence de la capacité des anticorps à induire un retard sur gel de p53H273.

- 15            Figure 4 : Mise en évidence par ELISA de l'association des ScFv avec p53 sauvage. Ronds pleins : IgG 11D3 (1 µg/ml au départ); Ronds vides : IgG 421 (1 µg/ml au départ); Carrés : sérum polyclonal biotinylé (1 µg/ml au départ); Triangles pleins : ScFv 11D3-myc (au ½ au départ); Triangles vides : ScFv 421-myc (au ½ au départ); Losanges : ScFv irrelevant (anti-CD3, au ½ au départ).

- 20            Figure 5 : Mise en évidence des retards sur gel induits par les ScFv  
Figure 6 : Restauration de l'activité de liaison à l'ADN à des mutants de p53.

Figure 7 : Expression du ScFv421 dans les cellules H1299

Figure 8 : Restauration de l'activité transcriptionnelle du mutant H273 dans la lignée H358.

Figure 9 : Restauration de l'activité transcriptionnelle du mutant H273 endogène dans la lignée HT29.

### Exemples

#### **EXEMPLE 1 : Obtention et criblage de l'anticorps 11D3**

- 5 Cet exemple décrit la préparation, l'obtention et la sélection d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre la protéine p53, capables d'activer la fonction de liaison à l'ADN des formes mutées de p53.

##### 1.1. Obtention des protéines utilisées lors de l'immunisation des souris et le criblage des hybridomes.

- 10 La protéine p53 sauvage et différentes protéines p53 H273, p53 W248, p53 G281 correspondant à des mutations de la p53 sauvage fréquemment retrouvées dans des cellules tumorales ont été produites dans des cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* Sf9 infectées par un baculovirus recombinant et purifiées par affinité sur un gel d'agarose sur
- 15 lequel a été couplé l'anticorps polyclonal PAb421 ( Leveillard et al. , EMBO J. 15, 1615-1623 (1996)). Les protéines correspondant aux fragments 1-320 et 73-320 de la protéine p53 sauvage ont été produites également dans des cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* Sf9 infectées par un baculovirus recombinant en suivant les instructions données par la Société Invitrogen.
- 20 Les ADN complémentaires insérés dans le plasmide de transfert pBlueBacIII ont été générés par des techniques classiques de l'ADN recombinant décrites par exemple par Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch & Maniatis : Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition , 1989, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

##### 1.2. Obtention et criblage des hybridomes

Les souris ont été immunisées avec un mélange équimolaire des trois protéines mutantes de p53 décrites ci-avant et les hybridomes ont été

obtenus en suivant les protocoles opératoires décrits par Harlow et Lane (Harlow & Lane : Antibodies, a laboratory manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). La sélection des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines mutantes de p53 décrites ci-avant a été réalisée par la méthode de capture de l'anticorps produit dans le milieu de culture de l'hybridome dans des puits de plaques 96 puits en PVC dans lesquels avait été au préalable immobilisée une quantité de 1 microgramme du mélange équimolaire des trois protéines mutantes de p53 décrites ci-avant en suivant les protocoles opératoires décrits par Harlow et Lane (Harlow & Lane : Antibodies, a laboratory manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). Ce premier criblage a permis de sélectionner 317 hybridomes positifs. Après deux semaines d'amplification des hybridomes, les surnageants des hybridomes amplifiés ont été dans un premier temps réévalués par la méthode (méthode 1) de capture de l'anticorps mentionnée ci-avant puis classés en utilisant trois méthodes de criblage identiques dans le principe à celle mentionnée ci-avant sauf que la nature des protéines immobilisées était différente : dans les puits étaient immobilisés soit (méthode 2) la protéine p53 sauvage purifiée, soit (méthode 3) un extrait protéique de cellules Sf9 produisant le fragment 1-320 de la p53 sauvage, soit (méthode 4) un extrait protéique de cellules Sf9 produisant le fragment 73-393 de la p53 sauvage. Les extraits protéiques ont été obtenus par lyse par congélations/décongélations dans un tampon phosphate des cellules Sf9 puis ultracentrifugation des débris cellulaires. Sur les 317 surnageants d'hybridomes amplifiés, 162 ne répondaient plus dans la méthode 1. Les 155 restant étaient tous positifs dans la méthode 2. parmi ceux-ci, 33 (groupe A) étaient négatifs dans les méthodes 3 et 4, 115 (Groupe B) étaient positifs dans la méthode 3 et négatifs dans la méthode 4, et enfin 7 (groupe C) étaient positifs dans les deux méthodes. Les surnageants du groupe B correspondent aux surnageants contenant un anticorps dont l'épitope se situe dans les 73 premiers acides aminés de p53. 77 surnageants de ce groupe se sont avérés négatifs dans la méthode 2 quand ils étaient

préincubés avec le peptide (1mg/ml) correspondant à la séquence des 40 premiers acides aminés de p53. Un isotypage des anticorps du groupe A, des 38 anticorps du groupe B restant après élimination des 77 mentionnés ci-avant et de ceux du groupe C nous a permis d'éliminer les IgM. Ces résultats  
5 sont récapitulés dans la Figure 1.

42 anticorps ont ensuite été testés pour leur capacité à induire un supershift sur un complexe p53/DNA. Après purification sur protéine A/Sepharose, les anticorps ont été quantifiés. Des expériences de retard sur gel ont été réalisées en incubant 30ng de protéine p53 de type sauvage  
10 purifiée avec une sonde d'ADN marquée au 32P représentant une séquence de fixation spécifique de p53. 300ng des divers anticorps ont ensuite été ajoutés. Les complexes ont été résolus sur gel d'acrylamide.

Les résultats de la Figure 2 montrent que 27 de ces anticorps étaient capables d'induire un supershift. 19 parmi ces 27 ont été testés en  
15 substituant le mutant His273 à la protéine p53 sauvage dans la même expérience de retard sur gel.(Figure 3). Ces 19 anticorps ont tous donné des résultats positifs. L'anticorps n°26 présentait un retard plus prononcé que les autres. Cet anticorps a été désigné 11D3 et utilisé dans la suite des expériences.

## 20           **EXEMPLE 2 : Obtention des ScFvs 421 et D3M**

Les ScFvs ont été obtenus à partir des hybridomes par des techniques classiques de biologie moléculaire basées sur des PCR à l'aide d'amorces dégénérées spécifiques des régions VH et VL. Le ScFv dérivé de l'anticorps 11D3 a été désigné D3M. Sa séquence est représentée sur la SEQ ID n°2.  
25 La séquence du ScFv421 est représentée sur la SEQ ID n°1.

## **EXEMPLE 3 : Construction de vecteurs d'expression des ScFv**

Cet exemple décrit la construction de vecteurs utilisables pour le transfert des acides nucléiques de l'invention in vitro ou in vivo.

### 3.1. Construction de vecteurs plasmidiques

5 Pour la construction de vecteurs plasmidiques, 2 types de vecteurs ont été utilisés.

- Le vecteur pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Ce vecteur est un vecteur d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les ScFv ont été insérés dans ce vecteur sous forme de  
10 fragments HpaI-EcoRV. Ils sont ainsi placés sous le contrôle du promoteur de l'enhancer du virus SV40. Toutes les constructions décrites dans l'exemple 2 ont été introduites dans ce vecteur pour être testées dans les différents systèmes d'évaluation in vitro et in vivo.

- Le vecteur pCDNA3 (Invitrogen). Il s'agit également d'un vecteur  
15 d'expression eucaryote. Les acides nucléiques codant pour les ScFv de l'invention sont ainsi placés, dans ce vecteur, sous le contrôle du promoteur précoce du CMV. Toutes les constructions décrites dans l'exemple 2 ont été introduites dans ce vecteur sous forme d'un fragment Hind III / Not I.

### 3.2. Construction de vecteurs viraux

20 Selon un mode particulier, l'invention réside dans la construction et l'utilisation de vecteurs viraux permettant le transfert et l'expression in vivo des acides nucléiques tels que définis ci-avant.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été  
25 caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi

les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et un acide nucléique selon l'invention. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697, WO96/22378) et L5 (WO95/02697). Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'adénovirus selon l'invention comprend une délétion dans les régions E1 et E4. Selon un autre mode de réalisation préféré, il comprend une délétion dans région E1 au niveau de laquelle sont insérés la région E4 et l'acide nucléique de l'invention (WO96/13596). Dans les virus de l'invention, la délétion dans la région E1 s'étend préférentiellement des nucléotides 455 à 3329 sur la séquence de l'adénovirus Ad5.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero

et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN d'intérêt. La recombinaison homologue se produit après  
5 co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de  
10 recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %) ou des lignées capables de compléter les fonctions E1 et E4 telles que décrites notamment dans  
15 les demandes n° WO 94/26914, WO95/02697 et WO96/22378.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN  
20 de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le  
25 génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le  
30 gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes



viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans une lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant une séquence nucléique de l'invention d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Une lignée cellulaire utilisable est par exemple la lignée 293. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que

notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

5            Pour construire des rétrovirus recombinants selon l'invention comportant un acide nucléique selon l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ledit acide nucléique est construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales  
10            déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus  
15            recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

20            Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes dans les cellules tumorales.

### 25            3.3. Vecteurs chimiques

Parmi les vecteurs synthétiques développés, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention les polymères cationiques de type polylysine, (LK<sub>2</sub>LK)<sub>n</sub>, (LK<sub>2</sub>L)<sub>n</sub> (WO95/21931), polyéthylène imine (WO96/02655) et DEAE

dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, WO95/18863, WO96/17823) différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) ainsi que des peptides d'origine nucléaire (WO96/25508). En outre, le concept de la transfection ciblée a été développé, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit. La préparation d'une composition selon l'invention utilisant un tel vecteur chimique est réalisée selon toute technique connue de l'homme du métier, généralement par simple mise en contact des différents composants.

#### **EXEMPLE 4 : Les scFvs reconnaissent p53**

L'association des ScFvs avec p53 a été vérifiée en test ELISA.

Un tag myc a été fusionné aux scFvs pour permettre leur détection. Les ScFvs 421, 11D3 (D3M) et un ScFv contrôle (anti-CD3) ont été produits à partir de périplasmes de bactéries exprimant ces différents ScFvs.

Des plaques ELISA coatées à l'aide de p53 purifiée sont incubées avec différentes dilutions de l'IgG 11D3, l'IgG 421, un sérum polyclonal biotinylé anti p53, le scFv 11D3, le ScFv 421 et le ScFv anti-CD3.

Les deux IgG sont ensuite révélées par un anticorps secondaire anti IgG couplé à la phosphatase alcaline. Le sérum biotinylé est révélé par de l'extravidine couplée à de la phosphatase alcaline. Les scFvs sont révélés par l'anticorps 9E10 anti-myc, puis par un anticorps anti IgG couplé à la

phosphatase alcaline. Un dosage colorimétrique de l'activité phosphatase alcaline est représenté sur la figure 4, indiquant que les deux IgG purifiées, le sérum polyclonal et les ScFvs 421 et 11D3 reconnaissent p53 alors que le ScFv anti-CD3 est inactif.

5 **EXEMPLE 5 : Les ScFvs sont capables d'induire un supershift à la p53 sauvage**

La capacité des ScFvs à activer la fonction DNA binding de la p53 sauvage a été testée par des expériences de retard sur gel.

10 Un duplex d'ADN représentant un site de fixation spécifique de p53 a été marqué au  $^{32}\text{P}$  puis incubé avec de la p53 sauvage purifiée et différents anticorps purifiés ou ScFvs produits dans des periplasmes bactériens. Les complexes sont résolus par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 5.

15 Le complexe ADN/p53 est observé dans la ligne « Basal ». Les anticorps HR231, pAb421 et 11D3 sont capables d'induire un retard supplémentaire (supershift) et d'augmenter la quantité de complexe ADN/p53.

20 Les ScFvs 421 et D3M sont capables également d'induire un supershift alors qu'un ScFv contrôle anti-ras (Y28) est silencieux. Le ScFv421, contrairement au ScFv D3M induit une augmentation de la quantité de complexe p53/ADN.

**EXEMPLE 6 : Les scFvs sont capables de restaurer une fonction DNA binding à un mutant de p53**

25 De manière analogue, Les ScFvs ont été testés pour leur capacité à restaurer la fonction DNA binding du mutant Trp248 inactif. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6.

Ils montrent que les deux ScFvs induisent l'apparition d'une bande retardée correspondant à un complexe p53/ADN.

**EXEMPLE 7 : Les ScFvs sont correctement exprimés dans des cellules tumorales**

5 L'expression des ScFvs a été vérifiée par transfection transitoire de vecteurs d'expression (promoteur de SV40) dans des cellules tumorales H1299. Plus particulièrement, les acides nucléiques ont été administrés sous forme d'un vecteur plasmidique de type pSV2 (exemple 3), en présence d'un lipide cationique, la lipofectamine.

10 Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 7. Par Western blot sur un extrait total, on observe une bande majoritaire migrant vers les 30kD, qui correspond à la taille attendue. et confirme que les molécules sont exprimées à des niveaux significatifs dans les cellules tumorales.

**EXEMPLE 8 : Les ScFvs sont capables de restaurer partiellement la**  
15 **fonction transactivatrice des mutants His273.**

La fonctionnalité de ces ScFvs au sein de cellules tumorales sur la fonction transactivatrice déficiente des formes mutées de p53 a été mesurée de la façon suivante:

20 Des transfections transitoires ont été réalisées dans des lignées H358 ou H1299 (toutes deux délétées pour p53) ou dans la lignée HT29 (comportant le mutant p53 His 273). Ces transfections introduisaient des vecteurs d'expression pour la p53 de type sauvage ou les mutants H273 ou His175, pour les deux ScFvs et un plasmide rapporteur comprenant le gene CAT (chloramphenicol acetyl transferase) sous le controle d'un promoteur  
25 dépendant de p53. L'activité CAT mesurée 48h après transfection est le reflet de la fonction transactivatrice de p53.

Les resultats de la figure 8 indiquent que dans la lignée H358, les deux ScFvs sont capables de réactiver de façon significative l'activité transcriptionnelle du mutant His273. des résultats identiques ont été obtenus dans la lignée H1299.

- 5 De même, dans la lignée HT29, les deux ScFvs sont capables d'augmenter l'activité transcriptionnelle du mutant His273 endogène (Figure 9).

SEQUENCESSEQ ID n° 1 : Séquences nucléotidique et peptidique du 421

5 1/1 31/11  
 CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG  
 gln val gln leu gln gln ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val lys leu  
 61/21 91/31  
 TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG  
 10 ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys asp tyr tyr met his trp val lys gln arg  
 121/41 151/51  
 CCT GAA CAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TGG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT ACT GAA TAT  
 pro glu gln gly leu glu trp ile gly trp ile asp pro glu asn gly asp thr glu tyr  
 181/61 211/71  
 15 GCC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAT ACA GCC TAC  
 ala pro lys phe gln gly lys ala thr met thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr  
 241/81 271/91  
 CTG CAG CTC AGC AGC CTG GCA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAT TGT AAT TTT TAC GGG  
 leu gln leu ser ser leu ala ser glu asp thr ala val tyr tyr cys asn phe tyr gly  
 20 301/101 331/111  
 GAT GCT TTG GAC TAT TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT  
 asp ala leu asp tyr trp gly gln gly thr thr val thr val ser ser gly gly gly gly  
 361/121 391/ 1  
 TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC  
 25 ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser asp val leu met thr gln thr pro leu  
 421/141 451/151  
 ACT TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC  
 thr leu ser val thr ile gly gln pro ala ser ile ser cys lys ser ser gln ser leu  
 481/161 511/171  
 30 TTG GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA  
 leu asp ser asp gly lys thr tyr leu asn trp leu leu gln arg pro gly gln ser pro  
 541/181 571/191  
 AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC  
 lys arg leu ile tyr leu val ser lys leu asp ser gly val pro asp arg phe thr gly  
 35 601/201 631/211  
 AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AAC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA  
 ser gly ser gly thr asp phe thr leu lys ile asn arg val glu ala glu asp leu gly  
 661/221 691/231  
 GTT TAT TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TCT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGC ACC AAG CTG  
 40 val tyr tyr cys trp gln gly thr his ser pro leu thr phe gly ala gly thr lys leu  
 721/241  
 GAA ATC AAA  
 glu ile lys

**SEQ ID n° 2 : Séquences nucléotidique et peptidique du D3M**

	1/1	31/11
5	CAG GTC AAG CTG CAG GAG TCA GGG GCA GAA CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAT TTG gln val lys leu gln glu ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val asn leu 61/21	91/31
	TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys <u>asp tyr tyr met his</u> trp val lys gln arg 121/41	151/51
10	CCT GAA GAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATT GAT CCT GAG AGT GGT GAA ACT GAA TAT pro glu glu gly leu glu trp ile gly tyr ile asp pro glu ser gly glu <u>thr glu tyr</u> 181/61	211/71
	GCC CCG AAC TTC CAG GGC AAG GCC ACT GTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC <u>ala pro asn phe gln gly</u> lys ala thr val thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr 241/81	271/91
	CTG CAC CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACA ACC GTC TAT TAC TGT AAT GCA GTC ATC leu his leu ser ser leu thr ser glu asp thr thr val tyr tyr cys asn ala <u>val ile</u> 301/101	331/111
20	TAC TAT GAA TAC GAC GGC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC <u>tyr tyr glu tyr asp gly tyr ala leu asp tyr</u> trp gly gln gly thr thr val thr val 361/121	391/131
	TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC A' ser ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser asp ile glu 421/141	451/151
25	CTC ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC GCT ATG AGC TGC leu thr gln ser pro ser ser leu ala val ser ala gly glu lys val ala met ser cys 481/161	511/171
	AAA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAT TAC TTG GCT TGG TAT CAG <u>lys ser ser gln ser leu phe asn ser arg thr arg lys asn tyr leu ala</u> trp tyr gln 541/181	571/191
	CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA GTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGA gln lys pro gly gln ser pro lys val leu ile tyr <u>trp ala ser thr arg glu ser</u> gly 601/201	631/211
35	GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT val pro asp arg phe thr gly ser gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser ser 661/221	691/231
	GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTA CCG ACG TTC val gln ala glu asp leu ala val tyr tyr cys lys <u>gln ser tyr asn leu pro thr</u> phe 721/241	
40	GGC GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA gly gly gly thr lys leu glu ile lys	



### REVENDICATIONS

1. Procédé pour restaurer dans des cellules présentant une protéine p53 mutée une activité de transactivation p53-dépendante comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un anticorps simple chaîne capable de lier  
5 spécifiquement la protéine p53 mutée.
2. Procédé selon la revendication 1 comprenant l'introduction dans ladite cellule d'un acide nucléique comprenant une séquence codant pour ledit anticorps simple chaîne sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans la cellule.
- 10 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'anticorps simple chaîne est capable de lier spécifiquement un épitope présent dans la région C-terminale de p53 portant le domaine d'oligomérisation et le domaine de régulation.
- 15 4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'anticorps simple chaîne est capable de lier spécifiquement un épitope présent dans la région C-terminale de p53 comprise entre les résidus 320-393.
5. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que l'anticorps simple chaîne est choisi parmi le ScFv421 de séquence SEQ ID n° 1 et le 11D3 de séquence SEQ ID n° 2.
- 20 6. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur.
7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur viral.
8. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le vecteur est un  
25 adénovirus recombinant défectif.

9. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le vecteur est un rétrovirus recombinant défectif.

10. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le vecteur est un AAV recombinant défectif.

5 11. Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que le vecteur est un HSV recombinant défectif.

12. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur chimique ou biochimique.

10 13. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la protéine p53 mutée est dépourvue d'activité suppresseur de tumeur.

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que la protéine p53 mutée est une forme présente dans les cellules tumorales.

15. Procédé selon la revendication 14 caractérisé en ce que la protéine p53 mutée est choisie parmi les protéines p53H273, p53W248 et p53G281.

15 16. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la cellule présentant une protéine p53 mutée est une cellule tumorale.

17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que la cellule tumorale est une cellule d'une tumeur du poumon, du colon, tête et cou, hépatique, du cerveau.

20 18. Utilisation d'un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour modifier la conformation de ladite protéine p53 mutée.

19. Utilisation d'un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour la préparation d'une composition

pharmaceutique destinée au traitement des désordres hyperprolifératifs dans lesquels une protéine p53 mutée est impliquée.

20. Utilisation d'un acide nucléique codant pour un anticorps simple chaîne capable de lier spécifiquement une protéine p53 mutée pour la préparation  
5 d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des désordres hyperprolifératifs dans lesquels une protéine p53 mutée est impliquée.

21. La molécule 11D3 ou un variant reconnaissant le même épitope ou ayant une affinité améliorée.

22. Acide nucléique codant pour une molécule selon la revendication 21.

- 10 23. Acide nucléique selon la revendication 22 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ADNc, d'un ARN, d'un acide synthétique ou semi-synthétique.

24. Acide nucléique selon la revendication 23 caractérisé par la séquence SEQ ID n 2.

25. Composition comprenant un acide nucléique selon la revendication 22.

- 15 26. Composition comprenant une molécule selon la revendication 21.

27. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon la revendication 22 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour le traitement des désordres hyperprolifératifs.

**ORIGINAL**

## CRIBLAGES SECONDAIRES

→ Mapping N-terminal / central / C-terminal

### ELISA 1-320 / 73-320

WT	-	+	+	+
1-320	-	-	+	+
73-320	-	-	-	+
	perdus	C-ter	N-ter	central
	162	33	115	7

→ Sélection des anticorps N-terminaux

### ELISA WT + déplacement par peptides 1-40 / 34-73

77 anticorps déplacés par 1-40

27 anticorps déplacés par 34-73

11 anticorps non déplacés

→ Elimination des IgM

Isotypage

**ORIGINAL**

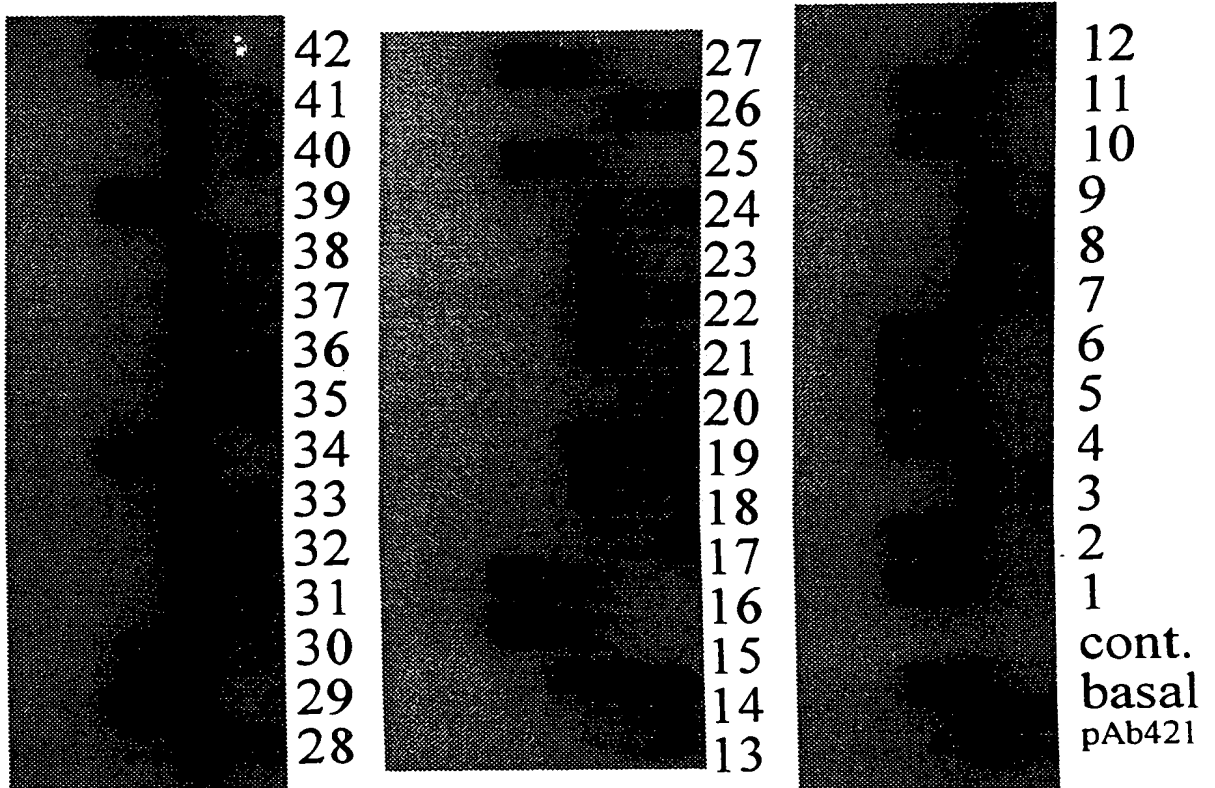


Figure 2

**ORIGINAL**

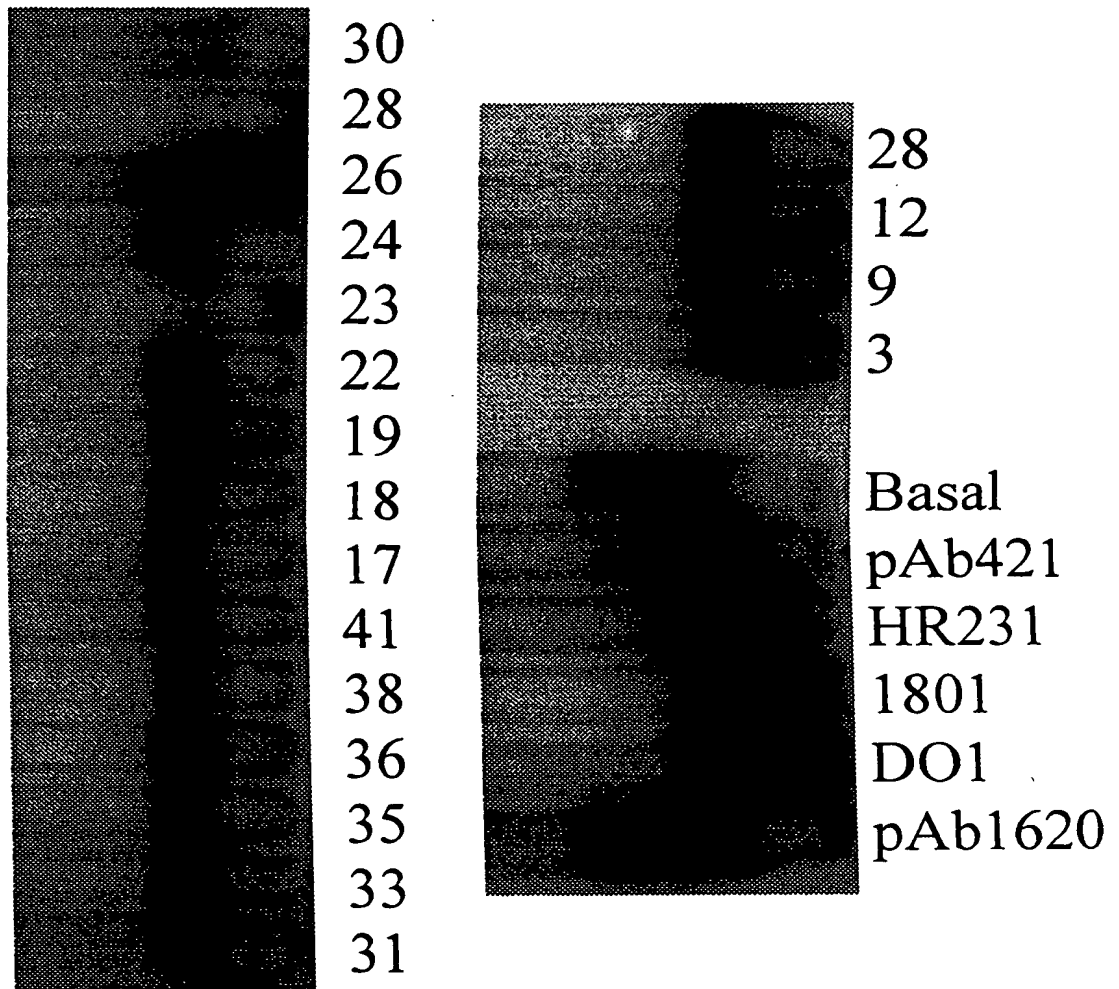


Figure 3

**ORIGINAL**

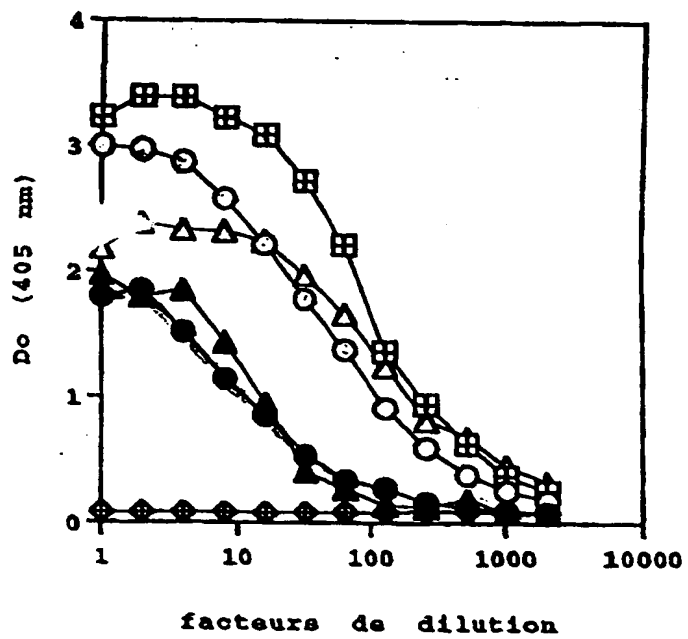
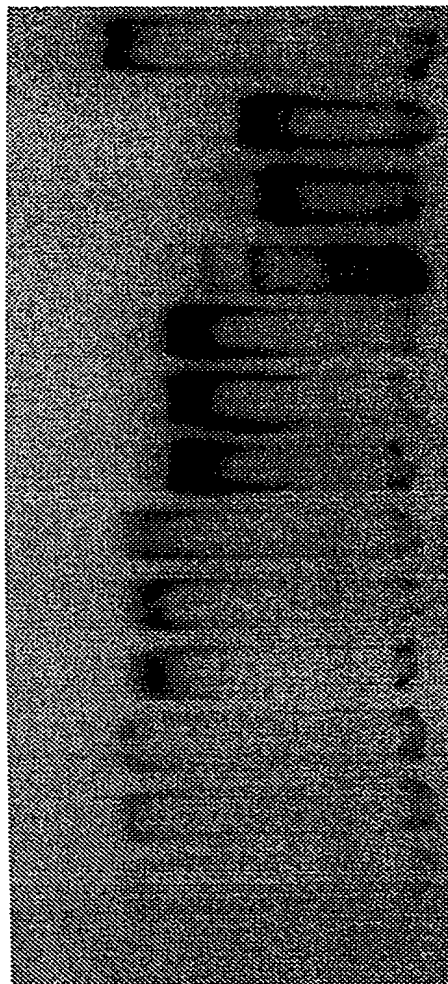


Figure 4

**ORIGINAL**



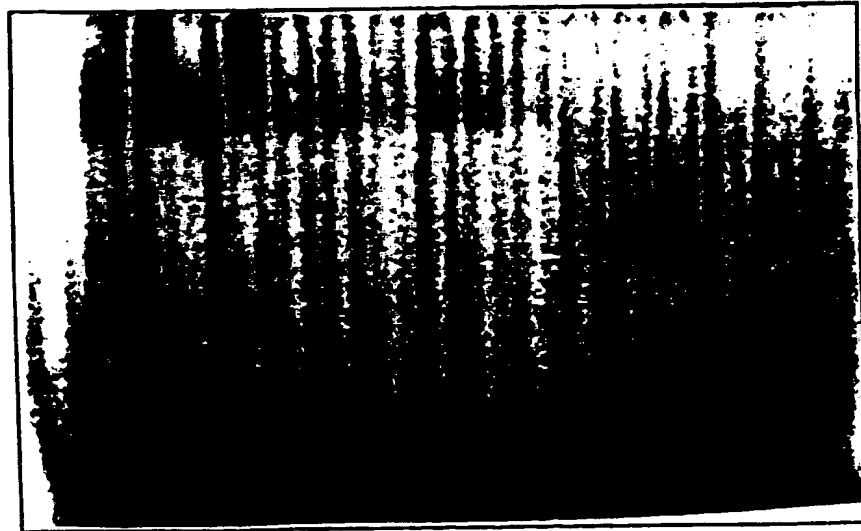
Basal  
+ HR231  
+ pAb421  
+ 11D3  
+ ScFv421 (2)  
+ ScFv421 (5)  
+ ScFv421 (10)  
+ ScFvD3M (2)  
+ ScFvD3M (5)  
+ ScFvD3M (10)  
+ ScFvY28 (2)  
+ ScFvY28 (5)  
+ ScFvY28 (10)

Figure 5

**ORIGINAL**



complexe  
p53-DNA-anticorps



p53 Trp248 seule			
p53 Trp248 + PAb421 purifié			
p53 Trp248 + HR231purifié			
p53 Trp248 + PAb1801 purifié			
p53 Trp248 + PAb421 non purifié			
p53 Trp248 +			10µl
p53 Trp248 + ScFv 11D3			5µl
p53 Trp248 +			2µl
p53 Trp248 +			10µl
p53 Trp248 + ScFv 421			5µl
p53 Trp248 +			2µl
p53 Trp248 +			10µl
p53 Trp248 + ScFv contrôle			5µl
p53 Trp248 +			2µl
p53 Trp248 +			10µl
p53 Trp248 + périplasme seul			5µl
p53 Trp248 +			2µl

Figure 6

ORIGINAL

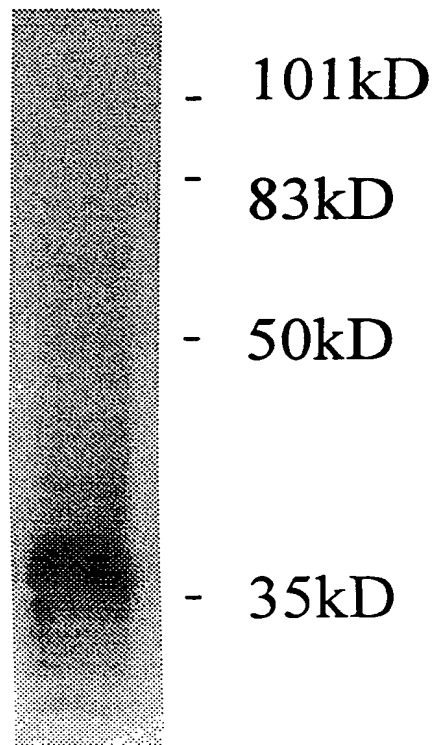


Figure 7

**ORIGINAL**

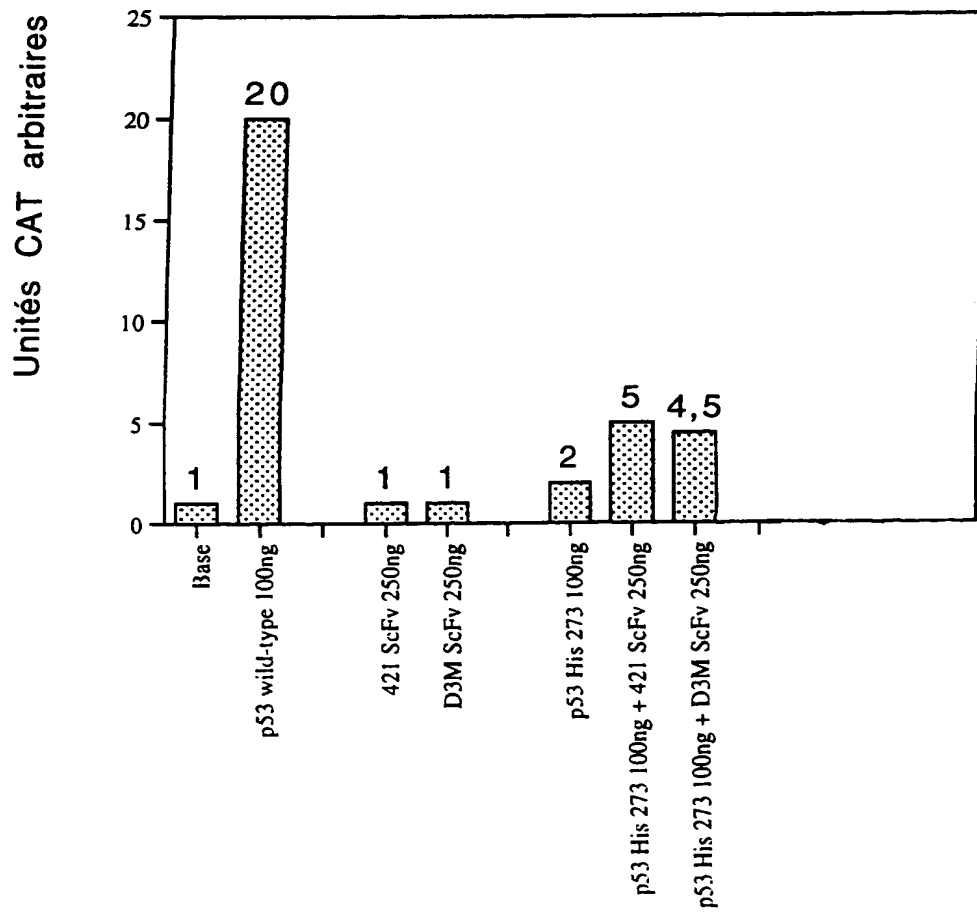


Figure 8

**ORIGINAL**

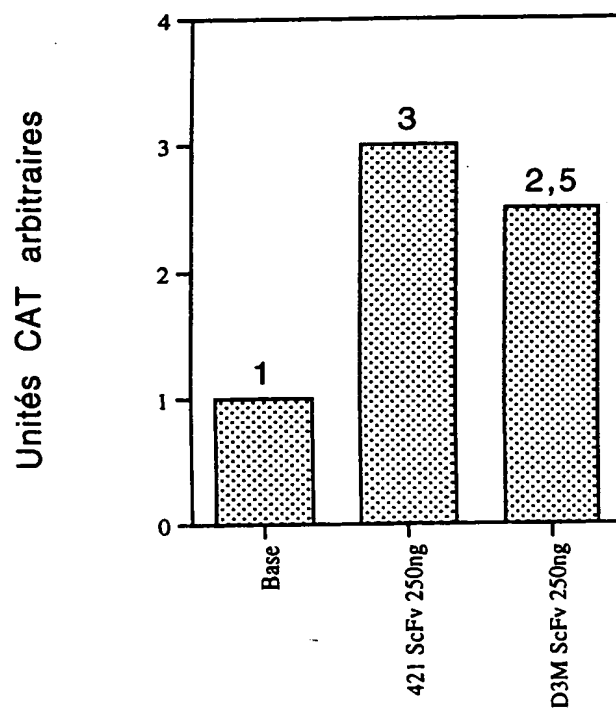


Figure 9

**ORIGINAL**